
Eine innovative Strategie zur Etablierung physiologisch relevanter Säugerzelllinien

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Franziska Klein
aus Schässburg

1. Referent:	Privatdozent Dr. Gerhard Gross
2. Referent:	Professor Dr. Michael Steinert
eingereicht am:	02.07.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	28.11.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Patent:

May, T.; Schucht, R.; Klein, F.; Zauers, J. & Hauser, H.:
Methods and Vectors for Cell Immortalization

Patent-Nummer: EP10014200.9

Anmeldung: 2. November 2010

Veröffentlichung: 10. Mai 2012

Kennzeichen: WO2012/059223A1

Tagungsbeiträge

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Biological relevant cells for the drug development process (Poster), 4th International Meeting on Angiogenesis, VU University Medical Center, Amsterdam (2011)

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Immortalized endothelial cell lines - Functional Immortalization (Vortrag), 1st Public Retreat, Quedlinburg (2010)

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Biological relevant cell lines for drug screening (Poster), World Congress on Preventive and Regenerative Medicine, KelCon, Hannover (2010)

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Novel endothelial cell systems (Poster) Skin in vitro, Dechema, Frankfurt (2010)

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Development of an endothelial screening system (Poster), International Summer School on Molecular Interactions during Infection, Juliusruh, Rügen (2010)

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Functional immortalization of endothelial cells (Poster), Cells meet surface, Dechema, Braunschweig (2010)

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Novel endothelial cell systems for drug screening (Poster), Zoonotic and vector-borne CNS Infection, Braunschweig (2010)

Klein, F.; May, T.; Schucht, R.; Zauers, J. & Hauser, H.: Biological relevant cells for the drug development process (Poster), Combined meeting of ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT, Hannover (2009)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Zellen	5
1.1.1	Primäre Säugerzellen.....	5
1.1.2	Klassische Säugerzelllinien	5
1.1.3	Induzierte pluripotente Stammzellen	6
1.1.4	Transdifferenzierung von Zellen	7
1.2	Zellzyklus.....	8
1.2.1	Die Interphase	8
1.2.2	Die M-Phase	10
1.2.3	Zellzyklus-Kontrollmechanismen	11
1.3	Gene zur Expansion von Zellen.....	19
1.3.1	Protoonkogene.....	19
1.3.2	c-Myc.....	20
1.3.3	ID-Proteine	20
1.3.4	c-Fos	21
1.4	Klassische Immortalisierungs-Strategien.....	21
1.5	Das Endothelium.....	22
1.5.1	Das Blutgefäßsystem	22
1.5.2	Das Endothel	24
1.5.3	Endothelzelltypen.....	25
1.5.4	Endotheliale Dysfunktion	26
1.6	Ziel der Arbeit	28
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Material	29
2.1.1	Geräte.....	29
2.1.2	Chemikalien.....	30
2.1.3	Antikörper	30
2.1.4	Enzyme	31
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.6	Oligonukleotide und Sequenzierung.....	31
2.1.7	Verwendete Software	31

2.2	Methoden	31
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.2	Restriktionsanalyse	32
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.4	Isolation genomischer DNA aus Säuger-Zellen	34
2.2.5	Präparation eukaryotischer RNA.....	35
2.3	Kultivierung von Säuger-Zellen.....	36
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	37
2.3.2	Kultivierung humaner Endothelzellen.....	37
2.3.3	Lentivirus-Produktion und Infektionsprozedur	37
2.3.4	Kryokonservierung und Auftauen von Säuger-Zellen	38
2.4	Charakterisierung der Endothel-Zellen	39
2.4.1	Populationsverdopplung	39
2.4.2	Durchflusszytometrie	39
2.4.3	Angiogenese	41
2.4.4	Tumorigenität.....	42
2.4.5	Transkriptom-Analyse	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Innovative Strategie zur Etablierung physiologisch relevanter Säugerzelllinien	44
3.2	Aufbau und Transduktion der Immortalisierungs-Genbank	44
3.3	Generierung funktionaler physiologisch relevanter Endothelzelllinien.....	47
3.3.1	Humane Nabelschnur Endothel-Zelllinien	47
3.3.2	Humane mikrovaskuläre Endothel-Zelllinien	54
3.3.3	Porzine Blut-Hirn-Schranken Endothel-Zelllinien.....	59
3.4	Funktionale Immortalisierung und physiologische Relevanz	61
3.4.1	Morphologie der Endothelzellen	62
3.4.2	Endothelspezifische Oberflächenmarker	62
3.4.3	Funktionale Charakterisierung.....	70
3.4.4	Globale Transkriptom-Expressionsanalyse	79
3.4.5	Tumorigenität.....	81
3.4.6	Stabilität der Expression von endothelspezifischen Markern und Funktionen in den HUVEC-Linien I38-2, I38-4 und I38-5	85

3.4.7	Reproduzierbarkeit der Immortalisierung und des Phänotyps.....	92
4	Diskussion	97
4.1	Effekte der in der essentiellen Kombination der HUVEC-Linien gefundenen Gene .	97
4.2	Reproduzierbarkeit ohne phänotypisch detektierbaren Positionseffekt	102
4.3	Zelltypspezifische Kombination der Immortalisierungsgene	103
4.4	Tumorigenität der HMVEC Linie I46-12.....	104
4.5	Porzine Blut-Hirn-Schranken Endothel-Zellen.....	105
4.6	Anwendungsgebiete der etablierten Zelllinien	106
4.6.1	3D-Modelle.....	108
4.6.2	Vergleich verschiedener Ansätze zu Generierung physiologisch relevanter Zellen	109
5	Ausblick	114
6	Zusammenfassung	115
7	Referenzen	116
8	Abbildungsverzeichnis	141

1 Einleitung

1.1 Zellen

Säugerzellen sind heutzutage ein unverzichtbares Instrument der Biologie, Pharmakologie und der Medizin (Eglen and Reisine 2011). Anwendungsbezogene Prozesse wie zum Beispiel die Medikamentenentwicklung und biopharmazeutische Proteinproduktion (Goldbard 2006, Horrocks et al. 2003, Sterling et al. 2008, Eglen and Reisine 2011), aber auch die Grundlagenforschung sind auf Säugerzellen angewiesen. In Bezug auf regenerative Medizin und Zelltherapie sind Säugerzellen ebenfalls von hohem therapeutischem Interesse (Nicholas and Kriegstein 2010, Robinton and Daley 2012). Für die genannten Belange können entweder primäre Zellen oder aber Zelllinien verwendet werden (Goldbard 2006, Horrocks et al. 2003). Beide Optionen verfügen jedoch über signifikante Vor- und Nachteile.

1.1.1 Primäre Säugerzellen

Der Vorteil primärer Zellen ist, dass sie die bestmögliche Annäherung an die *in vivo* Situation darstellen, da sie den physiologischen Phänotyp der nativen Zelle reflektieren. Daher haben Ergebnisse von Untersuchungen, die in primären Zellen vorgenommen werden, die beste Aussagekraft in Anbetracht der *in vivo* Situation (Eglen and Reisine 2011, Goldbard 2006, Eglen, Gilchrist and Reisine 2008).

Jedoch ist ihre Population heterogen, wodurch die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen fraglich ist. Sie unterscheiden sich oft stark in ihren Eigenschaften, aufgrund unterschiedlicher Donoren, Chargen und Passagenanzahl. Zudem ist es nicht ohne weiteres möglich, von jedem gewünschten Zelltyp primäre Zellen zu isolieren, da für viele Zellarten die Quelle für die Versorgung mit genügend Zellmaterial für Untersuchungen fehlt, die Isolation langwierig ist und die primären Zellen somit kostspielig sind. Nicht zuletzt ist der größte Nachteil primärer Zellen ihre kurze Lebensdauer, aufgrund ihres geringen Proliferationspotentials, wodurch nicht genügend Zellmaterial für industrielle Anwendungen zur Verfügung steht, beziehungsweise immer wieder neues Zellmaterial beschafft werden muss (Eglen and Reisine 2011, Goldbard 2006).

1.1.2 Klassische Säugerzelllinien

Im Vergleich dazu weisen Zelllinien eine unbegrenzte Proliferation auf und sind einfach zu kultivieren, wodurch schnell und effizient große Mengen an Zellmaterial generiert werden können und sie über lange Zeiträume in Kultur gehalten werden können. Darüber hinaus weisen sie eine hohe Reproduzierbarkeit der in ihnen gewonnenen Erkenntnisse auf, da ihre Population homogen ist und sie über konstante Eigenschaften verfügen (Goldbard 2006, Stacey and MacDonald 2001, Horrocks et al. 2003).

Andererseits fehlen Zelllinien, entweder durch die zur Immortalisierung verwendeten Onkogene (Vass-Marengo et al. 1986) oder aber dadurch, dass sie aus Tumoren entstanden sind, wichtige Aspekte der nativen Funktion der primären Zellen (Strauss and Griffin 1990). Somit weisen sie einen veränderten Phänotyp gegenüber der *in vivo* Situation auf (Horrocks et al. 2003) und die Aussagekraft und Relevanz von Ergebnissen die in Zelllinien erzielt werden konnten, sind hinsichtlich des physiologischen Phänotyps des Ursprungsgewebes mehr als fraglich (Eglen and Reisine 2011). Aufgrund dessen müssen solche Ergebnisse in arbeits-, kosten- und zeitaufwendigen Versuchen in primären Zellen oder Tierversuchen verifiziert werden, um sicherzugehen, dass es sich dabei nicht um ein Artefakt handelt (Stacey and MacDonald 2001).

1.1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen

Induzierte pluripotente Stamm-Zellen (im Folgenden iPS) ermöglichen die De-Differenzierung eines adulten Zellstadiums in einen pluripotenten Zustand, von dem dann wiederum ausgehend, eine Differenzierung in potentiell jeden gewünschten Zelltyp vorgenommen werden kann, um die zur Anwendung benötigte Zellmasse zu produzieren (siehe 4.6.2).

Die iPS-Methode ermöglicht eine ethisch vertretbare Stammzell-Forschung und gibt Hoffnung für eine zukünftige Patienten-spezifische Zell-Therapie (Bostrom et al. 2012, Cezar 2007, Lou and Liang 2011). iPS-Zellen könnten die Behandlung von Patienten mit eigenen Stammzellen ermöglichen, wodurch eine Abstoßung durch den Körper oder die Übertragung von Krankheiten enorm reduziert werden kann. Sie haben zudem das Potential, die Ursache und den Verlauf von Erbkrankheiten zu untersuchen und aufzuklären (Zhu et al. 2011), wenn man sie aus den Zellen von betroffenen Patienten generiert (Eglen and Reisine 2011).

Takahashi und Yamanaka revolutionierten 2006 das Feld der Reprogrammierung (Takahashi and Yamanaka 2006), indem es ihnen gelang, durch die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren und der Kultivierung unter embryonalen Stammzell- (im Folgenden ES) Bedingungen, adulte somatische Zellen in pluripotente embryonal-ähnliche Zellen zu konvertieren. Sie identifizierten aus einem Set von 24 Genen, die aufgrund ihrer bekannten Rolle in der Aufrechterhaltung der ES-Zellidentität ausgewählt wurden, das essentielle Set der vier Gene, OCT3 (oder POU5F1 oder OCT4), Sry box-containing factor 2 (SOX2), Krüppel-like factor 4 (KLF4) und c-Myc, da diese Kombination von Faktoren, nach lentiviraler Transfektion von adulten Mausfibroblasten, zu der charakteristischen Morphologie und den Wachstumseigenschaften von ES-Zellen führte. Sie nannten diese Zellen Induced pluripotent Stem Cells, da die Pluripotenz dieser Zellen in einem bereits adulten Zellstadium durch die Verwendung der vier Faktoren induziert wurde. Die erfolgreiche Reprogrammierung der somatischen Zellen in ein pluripotentes Stadium, konnte dabei durch die Bildung von Teratomen aus allen drei Keimblättern (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) *in vivo* und von embryonalen Körperchen *in vitro* gezeigt werden. 2007 gelang dann zum ersten Mal die

Generierung von IPS-Zellen aus adulten humanen Fibroblasten (Takahashi et al. 2007, Yu et al. 2007).

Eines der größten Probleme der IPS-Zellen in Bezug auf die potentielle klinische Anwendung ist jedoch ihre Neigung zur Tumorbildung (Laurent et al. 2011). Des Weiteren ist die IPS Generierung trotz vielfältiger Optimierung (Gonzalez, Boue and Izpisua Belmonte 2011, Warren et al. 2010, Anokye-Danso et al. 2011) leider sehr ineffizient. Nur eine von tausend Zellen kann reprogrammiert werden (Sridharan and Plath 2008). Der anschließende Schritt der Differenzierung der IPS-Zellen in den eigentlich gewünschten somatischen Zelltyp, zur Generierung der Zellmasse, ist jedoch das eigentliche Problem der IPS-Methode. Diese Differenzierung ist de facto noch ineffizienter als die IPS-Generierung selbst, langwierig, kostspielig und gelingt oftmals nicht zu 100% (Robinton and Daley 2012). Zudem sterben die aus den IPS hervorgehenden differenzierten somatischen Zellen bereits nach kurzer Zeit (Nishikawa, Goldstein and Nierras 2008). Daher ist es mit dieser Methode, unter den aktuellen Bedingungen nicht möglich, die benötigte Versorgung der Forschung und Industrie mit Zellmaterial sicherzustellen (Eglen and Reisine 2011, Eglen et al. 2008, Lou and Liang 2011).

1.1.4 Transdifferenzierung von Zellen

Ein weiterer Ansatz zur Generierung von Zellmaterial zur Verwendung in unterschiedlichen Fragestellungen, ist die Transdifferenzierung (Cezar 2007)(siehe 4.6.2). Dabei wird ein adultes differenziertes Zellstadium direkt in einen anderen differenzierten Zelltyp konvertiert, ohne den Umweg der kompletten De-Differenzierung in ein pluripotentes Zwischenstadium.

Vierbuchen *et al.* gelang 2010 zum ersten Mal die direkte Konversion von adulten Maus-Fibroblasten (aus Mesoderm) in funktionale exzitatorische Neuronen (Ektoderm) des Zentralen Nervensystems (iN-Zellen), also zweier Zelltypen die aus unterschiedlichen Keimblättern hervorgehen (Vierbuchen et al. 2010). Vierbuchen brachte dazu anfangs 19 Gene, die zuständig für die neuronale Entwicklung und Funktion sind, über Lentiviren in die somatischen Maus Fibroblasten ein. Anschließend wurde das zur Konversion benötigte essentielle Set von Ascl1, Brn2 und Myt1l selektiert. Die generierten iN-Zellen bergen Hoffnung für das Verständnis der neuronalen Entwicklung, der Modellierung neuronaler Krankheiten und der regenerativen Medizin (Cezar 2007), im besonderen Bezug auf neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson.

Die Methode der Transdifferenzierung ist im Vergleich zu der iPS-Technik viel effizienter. Vierbuchen gelang die Generierung der adulten Neuronen mit einer Effizienz von 19,5% (Vierbuchen et al. 2010). Jedoch entspricht die Proliferationskapazität der transdifferenzierten Zellen, der von normalen adulten Zellen und ist daher sehr gering. Eine Methode zu Expansion der Zellen und somit zur Generierung von Zellmasse fehlt bis heute.

Der technische-, materielle- und Zeitaufwand dieser Methode ist enorm hoch und der Nutzen in Bezug auf die Versorgung der Forschung und Industrie mit Zellmaterial ist sehr gering (Lou and Liang 2011). Zudem ist die Methode der Transdifferenzierung bisher auf einige wenige Zelltypen beschränkt.

1.2 Zellzyklus

Um eine Immortalisierung zu erreichen, müssen die Mechanismen, die einen gewöhnlichen Ablauf des Zellzyklus und somit die typische Lebenserwartung des entsprechenden Zelltyps diktieren, außer Kraft gesetzt werden (Metz, Harris and Adams 1995, Linder and Marshall 1990). Dazu gehört sowohl die Inhibierung von Regulatoren, die den Zellzyklus negativ beeinflussen und zu einer Restriktion des Wachstums der Zellen führen, sowie die Aktivierung von Faktoren, die den Eintritt in die Proliferationsphase kontrollieren und somit für eine dauerhafte Progression des Wachstums sorgen (Reed 2003). Um diese Mechanismen zu verstehen, werden nun im Folgenden der Zellzyklus und seine Regulation erläutert.

Alle Organismen bestehen aus Zellen, die sich durch Teilung vermehren. Ein erwachsener Mensch besteht aus ca. 100 000 Milliarden Zellen, die aus einer einzigen Zelle, der befruchteten Eizelle, entstanden sind. Auch beim erwachsenen Menschen teilen sich einige Zellen ständig, um abgestorbene Zellen zu ersetzen. Damit sich eine Zelle teilen kann, muss sie an Größe wachsen, ihre Erbmasse kopieren und diese exakt auf die Tochterzellen verteilen (Baumann 2011). Dieser Prozess wird im Zellzyklus koordiniert. Der Zellzyklus ist somit der periodische Ablauf von Ereignissen in einer Zelle zwischen zwei Zellteilungen, also der Zeitraum, zwischen der Entstehung einer Zelle aus einer Mutterzelle, und ihrer erneuten Teilung in zwei weitere Tochterzellen. Er wird in verschiedene Phasen unterteilt.

In Abbildung 1 ist der Zellzyklus schematisch dargestellt, der sich aus der Mitose (M)- Phase (Teilungsphase) und die Interphase (Wachstumsphase) zusammensetzt, die ihrerseits wiederum in G1-, S-, G2- und G0-Phase unterteilt ist.

1.2.1 Die Interphase

In der Interphase bereitet sich die Zelle auf die Teilung vor und alle dafür notwendigen Vorkehrungen werden getroffen. Sie ist in die einzelnen Phasen G1, S und G2 unterteilt (siehe Abbildung 1).

1.2.1.1 Die G1-Phase

Alle G-Phasen tragen ihre Bezeichnung auf Grund ihrer Lage im Zellzyklus (vom englischen Gap für Lücke). Die G1-Phase ist das erste Stadium der Interphase und dient hauptsächlich

dem Wachstum (siehe Abbildung 1) (Massague 2004, Donjerkovic and Scott 2000, DelSal, Loda and Pagano 1996). Besonders in Vorbereitung der in der darauffolgenden S-Phase benötigten Replikationsenzyme und Histone, kommt es zu einer verstärkten Protein- und RNA-Synthese. Die Dauer dieser Phase ist von Zell-Art zu Zell-Art verschieden. Bei sich schnell vermehrenden Zellen z.B. Tumorzellen dauert diese Phase nur wenige Stunden, bei normalem Zellwachstum sehr lange. In der G1-Phase befindet der G1-Restriktionspunkt (siehe 1.2.3.1.1 und Abbildung 1), an dem durch Kontrollmechanismen entschieden wird, ob die Zelle den Zyklus ein weiteres Mal durchläuft und alles für die S-Phase vorbereitet ist, oder aber in die G0-Phase wechselt (Massague 2004, DelSal et al. 1996).

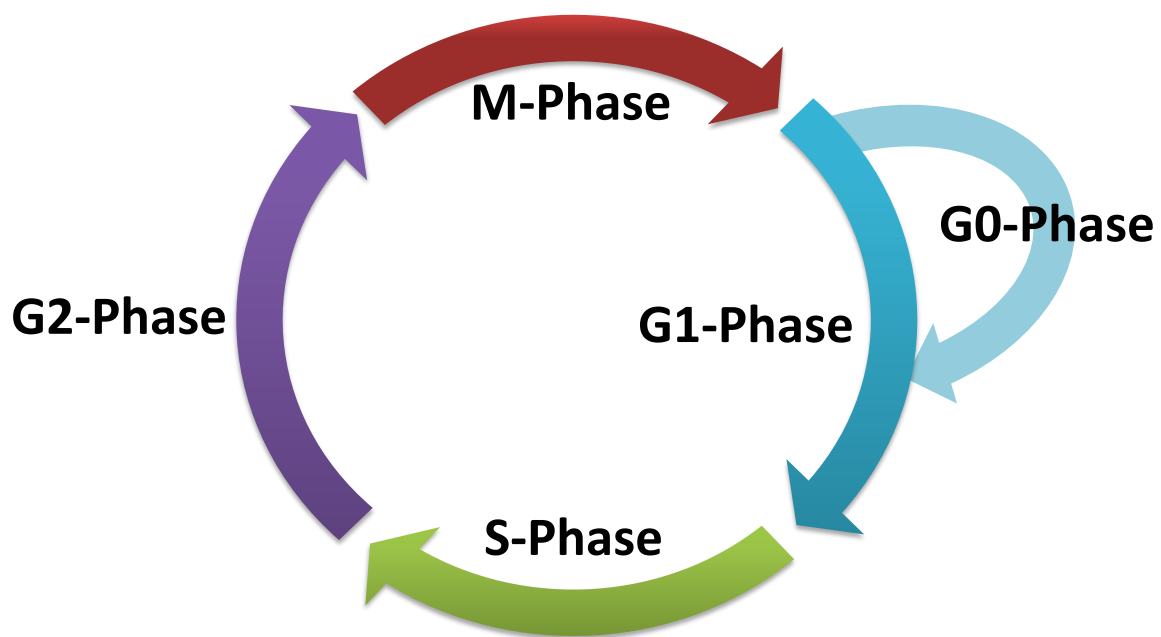


Abbildung 1: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus und seiner Phasen

In der Gap-1-Phase (G1-Phase) wächst die Zelle und bereitet sich auf den Eintritt in die Synthese-Phase vor. Zellen die nicht weiter proliferieren, gehen aus der G1-Phase in die Gap-0-Phase (G0-Phase) über und verbleiben in einem Ruhezustand. Wenn jedoch Wachstum durch mitogene Signale induziert wird, treten die Zellen in die Synthese-Phase (S-Phase) ein und replizieren ihr Genom. In der darauf folgenden Gap-2-Phase (G2-Phase) wächst die Zelle weiter und bereitet sich auf die Mitose vor. In der Mitose (M-Phase) wird letztendlich die Zellteilung vorgenommen.

1.2.1.2 Die G0-Phase

Tritt die Zelle nach ihrer Teilung in die G0-Phase ein, verlässt sie den Zellzyklus und beginnt den Differenzierungsprozess (siehe Abbildung 1) (Cooper 1987, Sun et al. 2007). In dieser Phase wächst die Zelle nicht mehr, sondern verbleibt in einem ausdifferenzierten Ruhestadium oder einem seneszenten Stadium. Viele Zellen verweilen für sehr lange Zeit in diesem Ruhestadium. Manche Zelltypen, wie zum Beispiel viele Neuronen, verweilen für immer in der G0-Phase. Jedoch können Zellen, durch Wachstumsfaktoren induziert, aus der

G0-Phase wieder in die G1-Phase überführt werden. Seneszenz hingegen ist ein endgültiges Zellschicksal (Mathon and Lloyd 2001). Seneszenz wird meist nach Schädigung der DNA induziert, als Schutz vor Tumorbildung, da durch das weitere Wachstum der beschädigten Zelle das Risiko der Entartung steigt (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Wenn die Zelle nach Schädigung also nicht durch Apoptose stirbt, wird sie seneszent und reduziert drastisch ihren Metabolismus (Schmitt 2003).

1.2.1.3 Die S-Phase

Die S-Phase ist der zweite Abschnitt der Interphase und wird auch als Synthese-Phase bezeichnet (siehe Abbildung 1) (Tromans 2001, Bartek, Lukas and Lukas 2004). In der S-Phase wird die DNA repliziert, Histone gebildet und am Ende haben sich die Chromatiden verdoppelt. Dieser Vorgang dauert ca. 8 Stunden.

1.2.1.4 Die G2-Phase

Die G2-Phase dient zur Vorbereitung auf die Mitose, dazu werden die benötigten Proteine produziert (siehe Abbildung 1). Die Zelle wächst ungefähr auf das Doppelte an, löst die Zellkontakte zu den benachbarten Zellen und rundet sich ab. Die Chromosomen kondensieren und es entsteht ein Spindelapparat. Auch diese Phase wird durch Aktivatoren geregelt. Am Übergang von der G2-Phase zur M-Phase findet sich der G2-Kontrollpunkt, durch den die Entscheidung über den Eintritt in die Mitose stattfindet (siehe Abbildung 2 und 1.2.3.1.2) (Lobrich and Jeggo 2007).

1.2.2 Die M-Phase

Ein M-Phase-stimulierender Faktor (MPF Mitose-promoting-Factor) sorgt für den Eintritt in die M-Phase (King, Jackson and Kirschner 1994). In der M-Phase laufen zwei Prozesse ab, erstens die Mitose und zweitens die Zytokinese und sie dauert circa eine Stunde (siehe Abbildung 1) (Walczak, Cai and Khodjakov 2010).

Die Mitose ist die häufigste Form der Karyokinese bei der aus einem Zellkern zwei Tochterkerne mit gleichem Erbgut entstehen. Sie wird in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt (Koshland 1994).

In der Zytokinese trennen sich die beiden Tochterkerne voneinander durch Ausbildung der Zellplatte und jedem Tochterkern wird eine gewisse Menge Zytoplasma zugewiesen (Barr and Gruneberg 2007).

1.2.3 Zellzyklus-Kontrollmechanismen

Die Phasenübergänge und kritischen Prozesse im Zellzyklus werden durch die Zellzyklus-Kontrollpunkte reguliert, um sicherzustellen, dass jede Phase akkurat beendet wurde bevor es zum Eintritt in die nächste Phase kommt. In Abbildung 2 sind die beiden Restriktionspunkte der G1 und G2 Phase schematisch dargestellt. Sie kontrollieren das geordnete und sequentielle Fortschreiten des Zyklus, sorgen für die Detektion und Reparatur von DNA-Schäden und sollen unkontrolliertes Zellwachstum verhindern. Sie dienen somit dem Schutz der Integrität des Erbgutes und sollen eine Entartung der Zelle verhindern. Bei jedem Kontrollpunkt kann es daher zu Arretierung des Zyklus oder zur Apoptose der Zelle kommen.

1.2.3.1 Zellzyklus Kontrollpunkte

Die Kontrollpunkte der Interphase befinden sich am Übergang von der G1 zu der S-Phase und der G2 zu der M-Phase (siehe Abbildung 2) (Malumbres and Barbacid 2001).

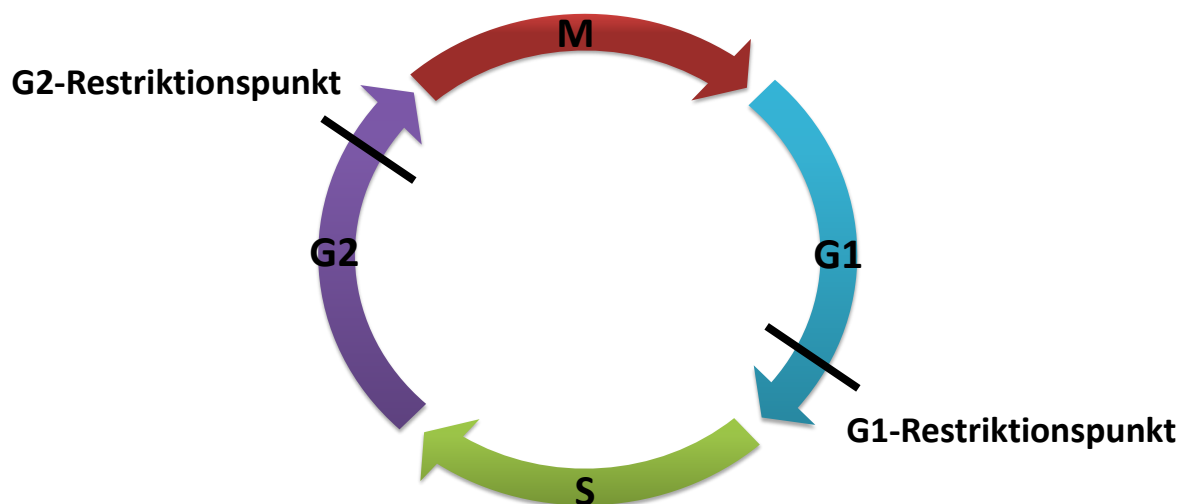


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Restriktionspunkte des Zellzyklus

Bei dem G1-Restriktionspunkt am Übergang von der G1 zu der S-Phase, wird durch Kontrollmechanismen entschieden ob alles für die S-Phase vorbereitet ist und die Zelle den Zyklus ein weiteres Mal durchläuft oder aber in die G0-Phase wechselt. Am Übergang von der G2-Phase zur M-Phase findet sich der G2-Kontrollpunkt, der den Eintritt in die Mitose kontrolliert.

Besonders während der Interphase besteht aufgrund gesteigerter Kernaktivität (Proteinbiosynthese und DNA-Replikation) ein erhöhtes Risiko für DNA-Schäden durch Kanzerogene (Vermeulen, Van Bockstaele and Berneman 2003). Alle Kontrollpunkte vereinen Sensor-, Signal- und Effektor-Mechanismen. Sensor-Mechanismen (CHK1, siehe 1.2.3.1.2) spüren DNA-Schädigungen auf (Branzei and Foiani 2008). Wenn Schädigungen

gefunden werden, wird durch Signal-Mechanismen (p53, siehe 1.2.3.3 und 1.2.3.1.2) deren Reparatur eingeleitet. Wenn eine Reparatur nicht möglich ist, wird durch Effektor-Mechanismen, wie dem p53-Signalweg (siehe 1.2.3.3) die Apoptose oder Seneszenz der Zelle induziert.

Diese Kontrollmechanismen funktionieren dabei durch die Interaktion von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (im Folgenden CDKs; Cyclin-dependent kinases) (Malumbres and Barbacid 2009, Hochegger, Takeda and Hunt 2008). Dabei stellen Cycline die regulatorische Untereinheit und CDKs die katalytische Untereinheit eines aktivierten Heterodimers dar (Lapenna and Giordano 2009). CDKs werden konstitutiv expremiert, sind aber ohne Bindung an ein Cyklin in einer inaktiven Form. Cycline hingegen werden nur kontrolliert synthetisiert. Cyclin-CDK-Komplexe aktivieren oder inaktivieren Zielproteine durch Phosphorylierung (Bloom and Cross 2007) oder markieren sie zur Ubiquitinierung und somit zur proteolytischen Degradation durch Proteasomen (Nakayama and Nakayama 2006, Reed 2003).

1.2.3.1.1 Der G1-Restriktionspunkt

Der G1-Restriktionspunkt befindet sich am Phasenübergang von G1- zur S-Phase in der Interphase des Zellzyklus (siehe Abbildung 3)(DeSal et al. 1996, Massague 2004).

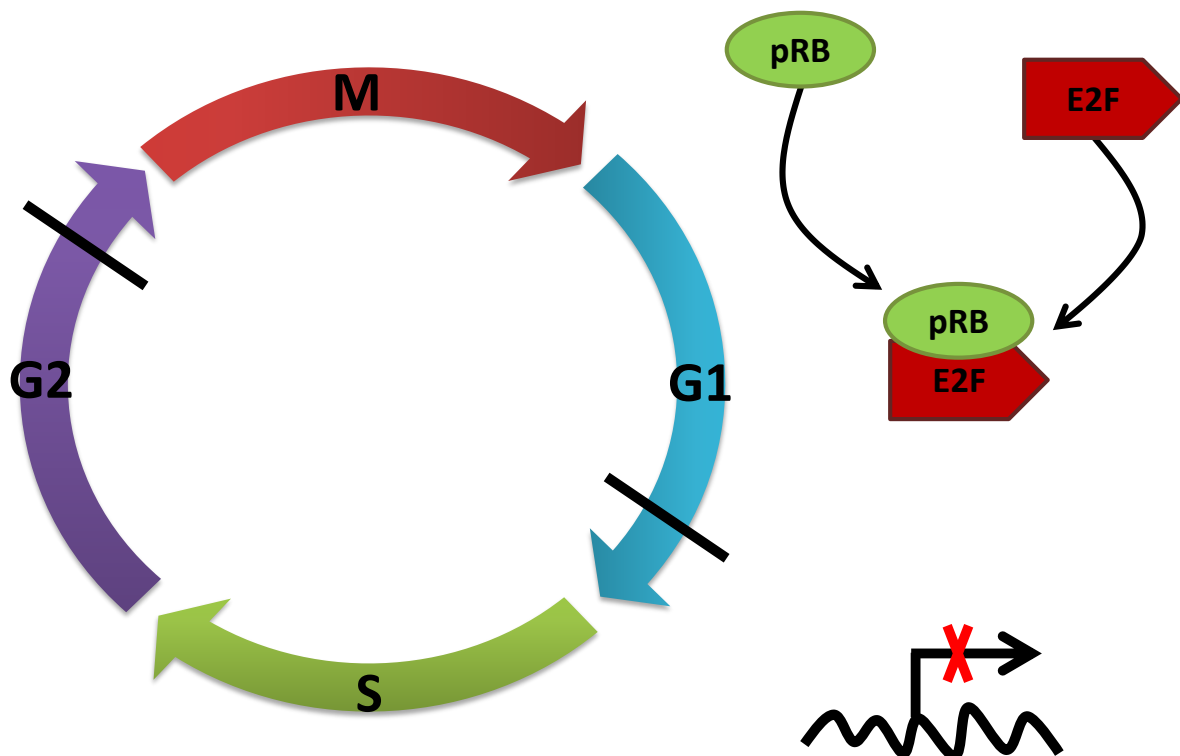


Abbildung 3: Mechanismus des pRB induzierten Zellzyklusblocks in der G1-Phase

In Abwesenheit von mitogenen Signalen ist pRB in seiner unphosphorylierten aktiven Form und bindet den Transkriptionsfaktor E2F. Dieser kann dadurch nicht an die DNA binden und die Transkription, der zur Transition in die S-Phase essentiellen Proteine aktivieren. Durch die komplexierung von pRB und E2F kommt es also zum Zellzyklusstop am G1-Restriktionspunkt.

Das Retinoblastom-Protein (im Folgenden pRB; siehe 1.2.3.2) wird am Ende der Mitose dephosphoryliert und geht somit in seine aktive Form über, in der es an den Transkriptionsfaktor E2F binden kann (siehe Abbildung 3) (van den Heuvel and Dyson 2008). Der Komplex aus aktivem pRB und E2F induziert den Zellzyklusstop, da dadurch das Binden von E2F an die DNA und somit die Transkription seiner Zielgene, deren Expression essentiell für den Eintritt in die S-Phase sind, geblockt wird (Schuldt 2011).

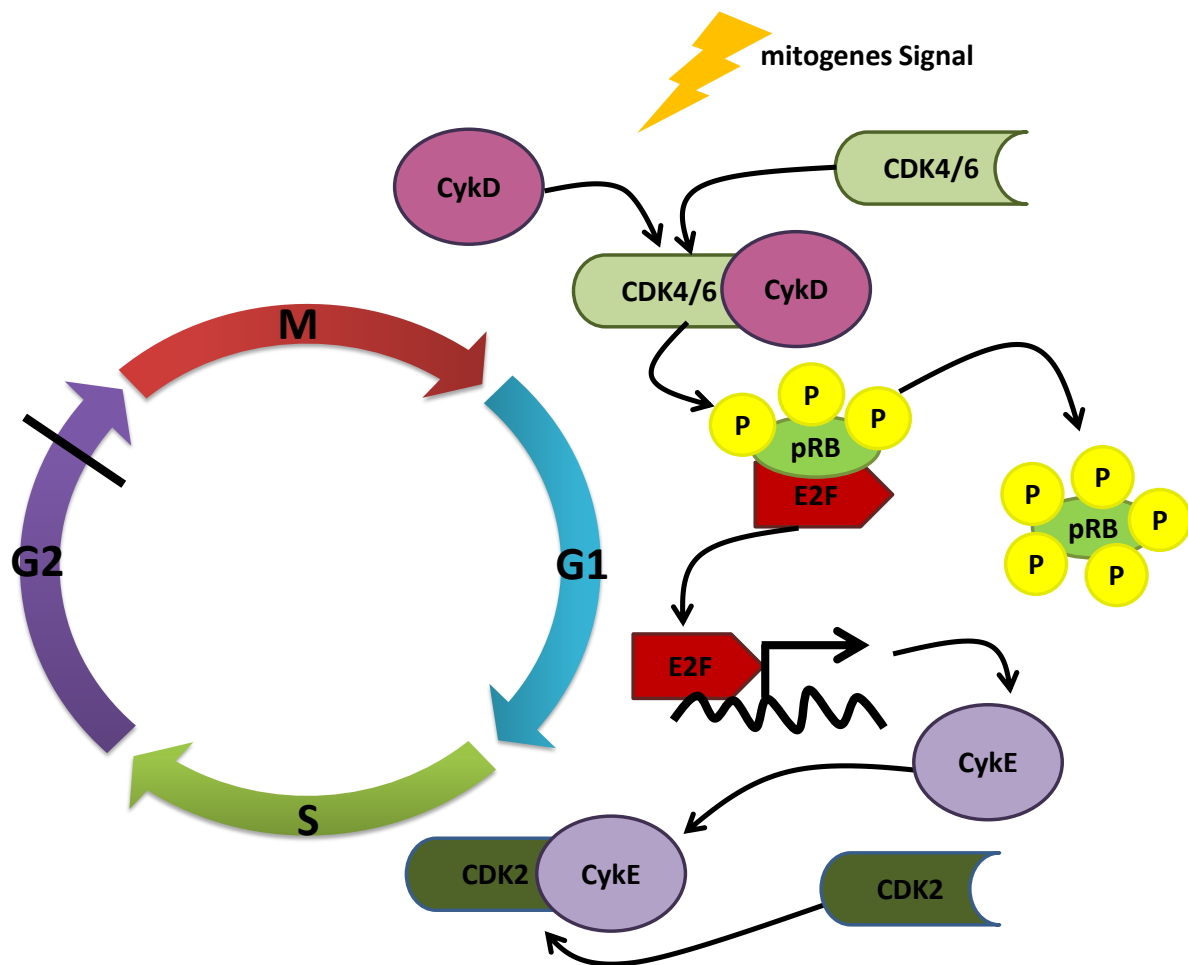


Abbildung 4: pRB vermittelte Transition aus der G1 in die S-Phase des Zellzyklus

Mitogene Signale induzieren die Expression von CyclinD, was dann mit CDK4/6 aktive Komplexe bildet und pRB phosphoryliert. Dadurch wird pRB inaktiviert und dissoziiert von dem Transkriptionsfaktor E2F. E2F ist nun frei und bindet an die DNA um die Transkription von CyclinE zu aktivieren. CyclinE komplexiert mit CDK2 und aktiviert die Expression von Proteinen die die Transition in die S-Phase ermöglichen.

Wenn jedoch extrazelluläre mitogene Signale auf die Zelle wirken, führt das zur Synthese von CyclinD (Brooksbank 2000), das dann wiederum mit CDK4 und CDK6 aktive Komplexe bildet (siehe Abbildung 4). Der Komplex CDK4/6-CyclinD phosphoryliert dann pRB, was dadurch inaktiviert wird. Das inaktivierte hyperphosphorylierte pRB kann E2F nicht mehr binden und dissoziiert von dem Transkriptionsfaktor (Chen, Tsai and Leone 2009). E2F

iniziert die Expression von Cyclin E. Cyclin E wiederum bindet dann CDK2, aktiviert die Transkription von Faktoren die gebraucht werden um von der G1 in die S-Phase zu wechseln und iniziert die Transition von der G1 in die S-Phase (Malumbres and Barbacid 2001).

1.2.3.1.2 G2-Kontrollpunkt

Der G2-Kontrollpunkt am Phasenübergang von G2- und Mitosephase wird durch CyclinB und CDK1 reguliert (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6)(Fukasawa 2007, Gavet and Pines 2010). Dabei wird kontrolliert, ob die in der S-Phase möglicherweise durch fehlerhafte Replikation entstandenen DNA-Schäden tatsächlich komplett repariert wurden (Branzei and Foiani 2008). Dabei kann eine Antwort auf das Signal von DNA-Schäden über einen p53-abhängigen oder p53-unabhängigen Signalweg erfolgen, die beide jedoch auf den Effektorkomplex von CDK1–CyclinB abzielen (siehe Abbildung 5, Abbildung 6 und 1.2.3.3).

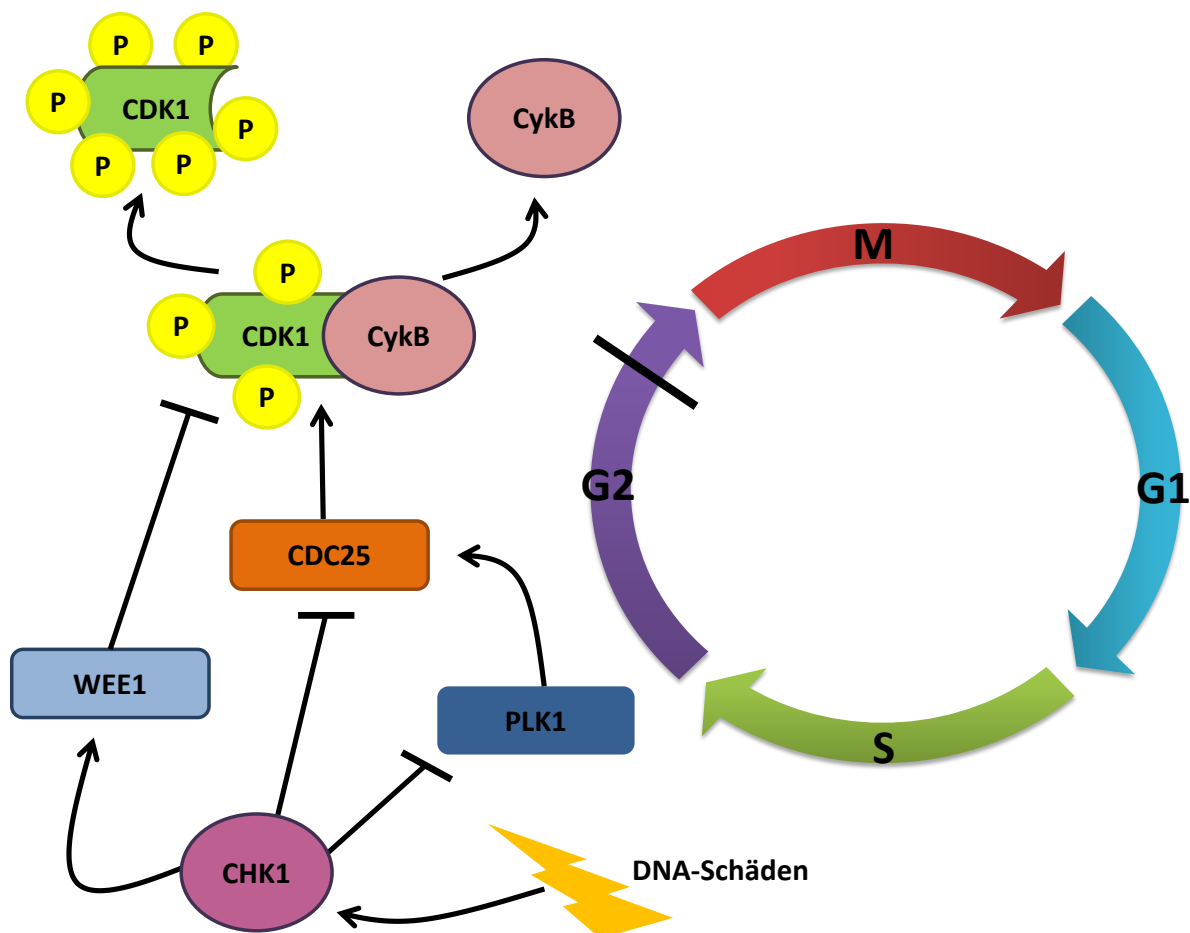


Abbildung 5: p53-unabhängiger G2-Zellzyklusblock

DNA-Schäden aktivieren CHK1, die wiederum CDC25 und PLK1 inhibiert. Des Weiteren aktiviert CHK1 WEE1. Durch diese Effekte wird die Phosphorylierung von CDK1 induziert, das daraufhin von CyclinB dissoziiert. Durch die Inaktivierung des CDK1-CyclinB-Komplexes kommt es zu einem Zellzyklusblock in der späten G2-Phase.

In dem p53-unabhängigen Weg werden die Cyclin-abhängigen Phosphatasen CDC25A, CDC25B und CDC25C (cell division cycle 25) (Rudolph 2007), die zum Ausbilden der bipolaren Spindel während der Prometaphase des Zellzyklus benötigt werden, durch die Serin/Threonin-Kinasen CHK1 und CHK2 phosphoryliert und inhibiert (siehe Abbildung 5) (Bartek and Lukas 2003, Lam and Rosen 2004). Zusätzlich inhibiert CHK1 auch die Proteinkinase PLK1 (Polo-like-Kinase1), die normalerweise für die Aktivierung von CDC25 zuständig ist, wenn keine Schäden vorliegen. Des Weiteren aktiviert CHK1 die WEE1 Kinase, die dadurch CDK1 phosphoryliert und inhibiert (McCarthy 2012, Sorensen and Syljuasen 2012). Somit kann CyclinB nicht an CDK1 binden, keinen aktiven Komplex formen und es kommt zum Zellzyklusblock in der späten G2-Phase (Fukasawa 2007).

In dem p53-abhängigen Weg des Zellzyklusblocks in der G2-Phase induziert durch DNA-Schäden, phosphoryliert CHK1 p53, was wiederum zu der Aktivierung der Transkription und Expression von p21 führt (siehe Abbildung 6) (Chen and Sanchez 2004, Chen and Poon 2008). p21 bindet dann an CDK1 und sorgt für die Dissoziation des CDK1-CyclinB-Komplexes, wodurch der Eintritt in die Mitose nicht katalysiert werden kann (Fukasawa 2007).

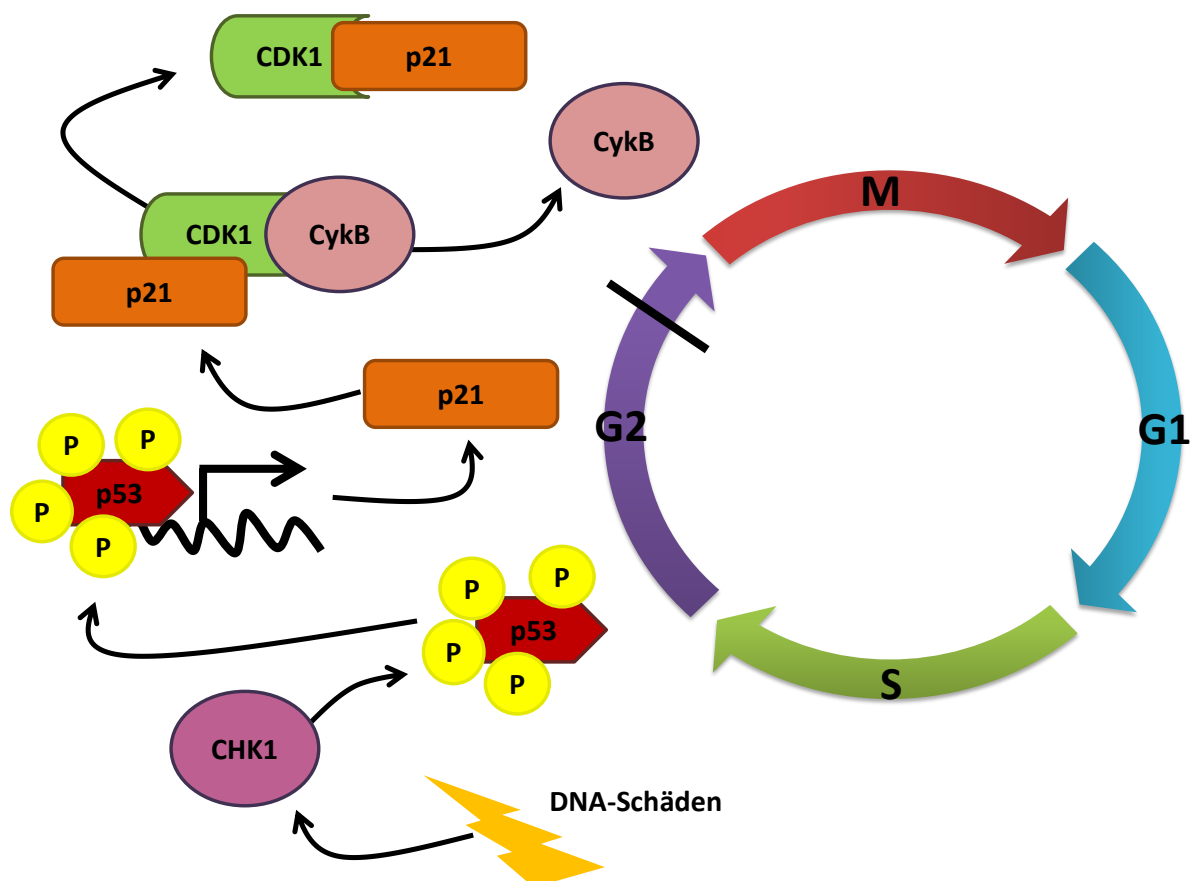


Abbildung 6: p53-abhängiger G2-Zellzyklusblock

DNA-Schäden aktivieren CHK1, das dann p53 phosphoryliert. p53 kann dadurch als Transkriptionsfaktor wirken und die Expression von p21 induzieren. p21 bindet daraufhin an CDK1, das von CyclinB dissoziiert und die Transition in die M-Phase nicht mehr katalysieren kann.

Wenn jedoch keine DNA-Schädigungen vorliegen aktiviert CDC25 den CDK1-CyclinB Komplex der die Transition von der G2 in die M-Phase katalysiert, die Degradation der Kernhülle initiiert und somit die Prophase der Mitose beginnt (Aressy and Ducommun 2008, Rudolph 2007, Millar and Russell 1992).

1.2.3.2 Das Retinoblastom-Protein pRB

pRB ist ein Tumorsuppressor, der zu den Pocket-Proteinen gehört, also über eine Bindungstasche für die Interaktion mit anderen Proteinen besitzt. Es interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen und ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel Zellzykluskontrolle, Differenzierung, Seneszenz, Apoptose, Genom-Stabilität und DNA Replikation (Gordon and Du 2011, Classon and Harlow 2002, Manning and Dyson 2012, Munro, Carr and La Thangue 2012). Eine der wichtigsten Interaktionen ist jedoch die zwischen pRB und dem Transkriptionsfaktor E2F und ihre Zusammenarbeit in vielen biologischen Prozessen (van den Heuvel and Dyson 2008, Goodrich 2006). Die wohl am bestuntersuchteste Funktion ist hierbei ihre Rolle in der Zellzyklusregulation.

Die Regulation von pRBs erfolgt über Phosphorylierungen, die durch Cyclin-CDK-Komplexe vermittelt werden (Hinds et al. 1992), wobei das Protein im Verlauf des Zellzyklus zwischen einem aktiven hypophosphorylierten und einem inaktiven hyperphosphorylierten Zustand pendelt (Mihara et al. 1989). Am Ende der Mitose wird pRB dephosphoryliert, geht somit in seine aktive Form über und kann nun den Transkriptionsfaktor E2F binden (siehe Abbildung 1) (van den Heuvel and Dyson 2008). Wenn pRB den Transkriptionsfaktor E2F gebunden hat, ist es in der aktiven hypophosphorylierten Form und die Zelle befindet sich in einem G1 Zellzyklus-Arrest (Burkhardt and Sage 2008). Wird die Zelle durch einen externen Stimulus zu Wachstum induziert, werden CyclinD-CDK4/CDK6 Komplexe gebildet (siehe Abbildung 4). Diese beginnen mit der Phosphorylierung von pRB, das dadurch eine Konformationsänderung vollzieht und schon einige E2F aus der Bindung entlässt. Diese wenigen E2F-Faktoren beginnen bereits die Transkription ihrer Zielgene (Blais and Dynlacht 2004, Bracken et al. 2004, Lavia and Jansen-Durr 1999), wie CyclinE zu aktivieren. Das neu synthetisierte CyclinE bildet mit dem bereits vorhandenen CDK2 aktive Komplexe und verstärkt die bereits durch CyclinD-CDK4/CDK6 begonnene Phosphorylierung von pRB. Letztendlich liegt durch die Zusammenarbeit der Cyclin-CDK-Komplexe pRB in der inaktiven hyperphosphorylierten Form vor und hat aufgrund seiner Konformationsänderung alle E2F-Faktoren freigegeben. E2F aktiviert die Transkription aller für die S-Phase wichtigen Proteine und es kommt zu der G1-S-Phasen Transition des Zellzyklus (siehe Abbildung 4) (Classon and Harlow 2002).

Ein weiteres Zielgen von E2F ist das Gen, das für das Protein p16 (siehe 1.2.3.4.2) kodiert (Dirks et al. 1998, Hengstschlager et al. 1996). Wenn es also zu der Synthese von p16 kommt, bindet dieses an CDK4 und CDK6 und verhindert dadurch die Komplexbildung mit CyclinD zu funktionalen Komplexen. Dadurch kann pRB nicht mehr phosphoryliert werden und geht

wieder eine Konformationsänderung durch, kann wieder E2F binden und ist in der aktiven hypophosphorylierten Form. Dadurch kommt es zu einem p16 induzierten Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase.

Des Weiteren wird pRB indirekt auch noch über p53 (siehe 1.2.3.3) in der aktiven, zellzyklusinhibierenden Form gehalten (Polager and Ginsberg 2009). Denn p53 induziert unter anderem die Expression des Proteins p21 (siehe 1.2.3.4.1 und Abbildung 6), das wiederum sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex hemmt. Somit kann pRB nicht phosphoryliert werden und E2F nicht freigesetzt werden, was letztendlich zu dem Zellzyklusstop in der G1-Phase führt (Linke et al. 1997).

1.2.3.3 Das Tumorsuppressor-Protein p53

Maßgeblich für die Kontrolle der Zellzyklus-Integrität ist p53 (Levine, Momand and Finlay 1991, Levine and Oren 2009). Seine essentielle Rolle als omnipotenter Tumorsuppressor (Meek 2009) wird dadurch reflektiert, dass seine Fehlfunktion fatale Folgen in Bezug auf das Zellschicksal hat, wie z.B. Tumorentwicklung (Stiewe 2007), Apoptose (Vazquez et al. 2008) oder Seneszenz (Sahin and Depinho 2012). Das Gen für p53 ist in mehr als 50% der menschlichen Tumoren mutiert (Levine 1997). p53 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression bei Schädigung der DNA und vielen weiteren Stress-Signalen sofort hochreguliert wird (Vousden 2002, Michael and Oren 2003, Junttila and Evan 2009). p53 induziert dann wiederum die Expression zahlreicher Zielgene (Menendez, Inga and Resnick 2009, Riley et al. 2008) die verschiedene zelluläre Antworten, wie zum Beispiel Zellzyklusblock (Polager and Ginsberg 2009), Differenzierung (Stiewe 2007), DNA Reparatur, Apoptose (Vazquez et al. 2008) oder Seneszenz induzieren (Vousden and Lu 2002).

Das Protein MDM2 (im Menschen HDM2) ist einer der Haupt-Interaktionspartner von p53 und sein zellulärer Schlüssel-Regulator. Es kann die biochemische Aktivität von p53 aktiv inhibieren (Momand et al. 1992), indem es an p53 bindet und seine Transaktivations-Domäne sterisch blockt (Oliner et al. 1993). Durch das Wirken als Ubiquitin-Ligase kann MDM2 die Ubiquitinierung von p53 vornehmen und somit für seinen Export aus dem Kern und seine proteosomale Degradation im Zytoplasma sorgen (Haupt et al. 1997). Des Weiteren ist MDM2 eines der essentiellen p53 Zielgene (Menendez et al. 2009, Riley et al. 2008), dessen Expression bereits durch sehr geringe p53 Konzentrationen aktiviert wird. Dabei bilden p53 und MDM2 eine negative Feedback-Schleife, in der p53 die Expression von MDM2 induziert und MDM2 wiederum für die Degradation von p53 sorgt, um seine zelluläre Aktivität und Konzentration zu reduzieren (Wu et al. 1993), denn in einer normalen, gesunden und nicht gestressten Zelle muss das Level an p53 niedrig sein. Durch Stresssignale wird dieser Kreislauf unterbrochen, wobei die verschiedenen Signale unterschiedliche Wege für die Inhibierung benutzen (Junttila and Evan 2009). Beispielsweise kann durch Phosphorylierung von p53 die Bindung von MDM2 unterbunden werden (Kussie et al. 1996) oder aber p14Arf (siehe 1.2.3.4.2) (Sherr 2006) bindet an MDM2 und verhindert dadurch die

Interaktion mit p53 und aktiviert zusätzlich noch die Ubiquitin-Protein-Ligase Aktivität von MDM2, wodurch die Konzentration an p53 steigt und es seine Funktion ausführen kann (Kamijo et al. 1998, Pomerantz et al. 1998). Des Weiteren wird durch Stress die Stabilität von p53 durch posttranslationale Modifikationen erhöht (Kastan et al. 1991), was in der Aktivierung der Transkription p53-abhängiger Gene resultiert.

1.2.3.4 **Negativ-Regulatoren des Zellzyklus**

Alle negativ-Regulatoren des Zellzyklus sind CDK-Inhibitoren. Zwei Genfamilien können das Fortschreiten des Zellzyklus verhindern, zum einen die cip/kip Familie (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) zum anderen die INK4a/ARF (Inhibitor of Kinase 4/Alternative Reading Frame) Familie.

1.2.3.4.1 Die cip/kip Tumorsuppressor Familie

Zu dieser Familie gehören die Gene, die für die Proteine p21, p27 und p57 kodieren. Sie arretieren den Zellzyklus in der G1-Phase, indem sie an Cyclin-CDK Komplexe binden und dadurch inaktivieren.

p21(cip1/waf1) hat vielfältige Funktionen und Effekte (Abbas and Dutta 2009). Es inhibiert unter anderem die Aktivität von Cyclin-CDK1 und -CDK2 Komplexen und kann dadurch für die Arretierung des Zellzyklus am Übergang von der G1-S-Phase und G2-M-Phase sorgen. Bei einem Stress-Stimulus wird seine Expression durch p53 kontrolliert, was dann zu dem p53-abhängigen G1-Zellzyklusarrest führt (el-Deiry et al. 1993, Gartel and Tyner 1999, Broude et al. 2007). Jedoch hat p21 auch viele p53-unabhängige Funktionen (Abbas and Dutta 2009). p21 beeinflusst auch den pRB Signalweg, indem es die CyclinE-CDK2 Komplexe inhibiert. Dadurch wird die Phosphorylierung von pRB verhindert und es bleibt in der aktiven hypophosphorylierten Form und an E2F gebunden, was letztendlich zu dem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase führt (Niculescu et al. 1998).

1.2.3.4.2 Die INK4a/ARF Familie

Der INK4a/ARF-Lokus kodiert für die zwei Proteine p16Ink4a und p14Arf (das humane homolog von p19Arf). Da p14Arf (Arf = alternative reading frame) in einem alternativen Leserahmen transkribiert wird, besitzen beide Proteine keinerlei Homologie zueinander. Jedoch reagieren sie beide auf proliferative Signale und modulieren die Aktivität der pRB und p53 Signalwege. Dabei ist p14Arf in den p53 und pRB Weg involviert (Sherr 2006, Bates et al. 1998), während p16Ink4a auf den pRB Signalweg wirkt (Sherr 2001, Hengstschlager et al. 1996).

Der Tumorsuppressor p14Arf verbindet die Signalwege von p53 und pRB (Bates et al. 1998). Er verhindert die Degradation von p53 und stabilisiert es, indem er an MDM2 bindet und beide in den Nucleolus wandern (Sherr 2001). Durch diese räumliche Trennung kann MDM2 nicht mehr an p53 binden, was zur Aktivierung von p53 führt. Somit kann p53 als Transkriptionsfaktor wirken und die Expression von seinen Zielgenen veranlassen. p53 induziert dadurch die Expression des Proteins p21, das wiederum sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex hemmt. Somit kann pRB nicht phosphoryliert werden und E2F nicht freigesetzt werden, was letztendlich zu dem Zellzyklusstop in der G1-Phase führt. p14Arf kann sowohl über einen p53-abhängigen (Kamijo et al. 1998) und p53-unabhängigen Signalweg in den Zellzyklus eingreifen, wenn er durch mitogene oder onkogene Signale aktiviert wird (Sherr 2006, Gil and Peters 2006). Die enorme Relevanz des p14Arf-MDM2-p53 Signalweges wird dadurch deutlich, dass er in Tumoren oft mutiert ist (Tannapfel et al. 2001).

Das Protein p16Ink4a ist ebenfalls in den pRB Signalweg involviert, da es eines der Zielgene von E2F ist (Hengstschlager et al. 1996). Wenn die Synthese von p16 durch E2F aktiviert wird, bindet dieses an CDK4 und CDK6 und verhindert dadurch die Komplexbildung mit CyclinD zu funktionalen Komplexen. Dadurch kann pRB nicht phosphoryliert werden und bleibt in der aktiven hypophosphorylierten Form, wodurch ein Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase induziert wird.

1.3 Gene zur Expansion von Zellen

1.3.1 Protoonkogene

Protoonkogene sind die Vorstufe von Onkogenen. Dabei handelt es sich um Gene die die normale Zellteilung, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren. Protoonkogene sind für die Funktion und das Überleben einer gesunden Zelle essentiell. Jedoch können Mutationen, welche durch Viren, ionisierende Strahlung und chemische Substanzen ausgelöst werden können, zu einer veränderten Expression der Protoonkogene führen (z.B. Translokationen). Dadurch können sie in die karzinogene Form der Onkogene umgewandelt werden. Alle Gene die den Zellzyklus kontrollieren sind potentielle Protoonkogene, da ihre Fehlfunktion, ausgelöst durch vielschichtige Ursachen, zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen kann und somit zu einer Tumorbildung (Stacey and MacDonald 2001).

Die in dieser Arbeit etablierten Genbank enthaltenen Expansionsgene sind direkt oder indirekt an der Regulierung des Zellzyklus involviert. Beispiele für prominente Vertreter dieser Gen-Bank, die eine wichtige Rolle in meiner Arbeit spielen, werden im Folgenden beschrieben.

1.3.2 c-Myc

c-Myc ist ein Sequenz-spezifischer DNA-bindender Transkriptionsfaktor (Meyer and Penn 2008) (siehe auch 4.1). Die Heterodimerisierung mit Max (Myc-assoziiierter Faktor X) ist essentiell um das Sequenz-spezifische Binden an die Enhancer-Boxen zu ermöglichen (Nair and Burley 2003). Durch das Binden des Myc-Max-Komplexes an Enhancer-Sequenzen wird die Transkription an den Promotoren der Myc Zielgene aktiviert. Myc-Max ist für die Regulierung der Transkription von 15% der Gene des gesamten humanen Genoms verantwortlich (Fernandez et al. 2003, Wu et al. 2008, Wu et al. 2012). Über die Regulierung der Transkription seiner Zielgene spielt Myc eine wichtige Rolle in der Kontrolle der metabolischen Adaption, dies wird durch die Aktivierung von ribosomaler RNA und deren Proteine erreicht (van Riggelen, Yetil and Felsher 2010). Ausserdem wird durch die Reprimierung von BCL2 Apoptose (Huang et al. 2006, Biroccio et al. 2001, Sarbia et al. 1999, Gatti et al. 2009) und Differenzierung moduliert (Baena et al. 2007, Aguda et al. 2011, Berta et al. 2010, Conacci-Sorrell, Ngouenet and Eisenman 2010, Leon et al. 2009, Wilson et al. 2004). Myc ist der Hauptregulator der Zell-Proliferation, da Cycline hochreguliert werden und p21 runterreguliert wird (Aguda et al. 2011, Berta et al. 2010, Kolly, Suter and Muller 2005, Verykokakis et al. 2007). Zusätzlich kontrolliert Myc direkt die DNA-Replikation (Cole and Cowling 2008) und die globale Chromatin-Struktur, durch das Kontrollieren der Histon-Acetylierung durch Rekrutierung von Histon-Acetyl-Transferasen (Guccione et al. 2006, Martinato et al. 2008).

1.3.3 ID-Proteine

Es sind vier humane ID (Inhibitor of Differentiation/ Inhibitor of DNA-binding) Proteine bekannt (Lasorella, Uo and Iavarone 2001), die alle Verwendung in der Immortalisierungs-Genbank finden. Sie werden Inhibitoren der Differenzierung genannt, da sie eine Schlüsselrolle in der Embryogenese spielen, indem sie die frühzeitige Differenzierung von Stammzellen verhindern können (Ruzinova and Benezra 2003, Strait et al. 2002). In ihrer normalen Funktion verhindern die ID-Proteine wenn sie expremiert werden die terminale Differenzierung von Zellen und halten die Zellen somit in einem stark proliferierenden Status. Dadurch induzieren die ID-Proteine die Proliferation von Zellen (Norton and Atherton 1998, Peverali et al. 1994, Barone et al. 1994) (siehe auch 4.1). Des Weiteren wurde mit Hilfe von ID1 eine Immortalisierung von primären Keratinozyten erreicht, indem es die Aktivität der Telomerase erhöht und pRB inaktiviert (Alani et al. 1999). Die ID-Proteine sind ebenfalls an der Steuerung der Angiogenese während der Entwicklung involviert (Lyden et al. 1999, Benezra, Rafii and Lyden 2001). ID-Proteine können selbst keine DNA binden, sondern binden durch Heterodimerisierung an Transkriptionsfaktoren der ersten und zweiten Klasse mit einem basic-helix-loop-helix (bHLH) Bindungsmotiv für die DNA (Sun et al. 1991). Das Binden der ID-Proteine an das bHLH-Motiv der Transkriptionsfaktoren passiert dabei in einer dominant-negativen Art und Weise. Durch das Verhindern der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA kann kein aktiver Transkriptionskomplex gebildet werden

und somit inhibieren die ID-Proteine die Wirkung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren (siehe auch 4.1). Transkriptionsfaktoren die durch IDs gebunden werden können sind z.B. Hypoxia-inducible Factors (HIFs) und MyoD, das zu den Myogenic regulatory Factors (MRFs) gehört und für die Differenzierung von Muskeln zuständig ist.

1.3.4 c-Fos

Das c-Fos Protein dimerisiert mit c-Jun zu dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Angel and Karin 1991). AP-1 reguliert die Expression diverser Zielgene mit breitem Wirkungsspektrum, von Proliferation und Differenzierung (Tay, Hoffbrand and Wickremasinghe 1996, Pai and Bird 1994, Lian et al. 1991, Elkeles et al. 1999), über Invasions-Abwehr (Milde-Langosch et al. 2004, Ikawa et al. 1998), bis hin zu Reparatur von Zellschäden und Apoptose (Christmann et al. 2007, Dosch and Kaina 1996, Kumahashi et al. 2004, Zhou et al. 2007). Die Expression von c-Fos wird durch viele extrazelluläre Faktoren, meist Wachstumsfaktoren, stimuliert. Des Weiteren interagiert c-Fos z.B. mit BCL3 (B-cell lymphoma 3-encoded protein), dem transkriptionellen Koaktivator von NF-kappa B (Stein et al. 1993) oder SMAD 3, wodurch es am Transforming growth factor beta (TGF- β)-Signalweg involviert ist (Norwitz et al. 2002, Zhang, Feng and Derynck 1998, Kerr, Miller and Matrisian 1990).

1.4 Klassische Immortalisierungs-Strategien

Um eine Immortalisierung zu erreichen müssen die Mechanismen außer Kraft gesetzt werden, die das Replikationspotential begrenzen (Stacey and MacDonald 2001, Strauss and Griffin 1990, Horrocks et al. 2003). Dies geschieht beispielsweise durch spontane Mutation von Tumorsuppressoren wie pRB, p53 (Gollahon et al. 1998, Harvey and Levine 1991), p16Ink4a (Drayton et al. 2003) oder p19Arf (Kamijo et al. 1997) oder durch die Überexpression viraler Onkogene (Linder and Marshall 1990, Horrocks et al. 2003). In klassischen Immortalisierungsansätzen wird die rekombinante Expression von fixen Genkombinationen aus starken Onkogenen eingesetzt (Strauss and Griffin 1990) oder einzelne, extrem starke Onkogene, wie das Simian Virus (im Folgenden SV40) large T Antigen (im Folgenden TAg) (Vass-Marengo et al. 1986) oder virale Onkogene wie E6/E7 aus dem Papilloma-Virus oder die adenoviralen Proteine E1A/E1B. Die alleinige Verwendung dieser Onkogene führt schon oft zu einer Entartung der Zelle, so dass die damit behandelten Zellen dadurch zwar immortalisiert werden können, jedoch eine dramatische Veränderung ihres nativen Phänotyps durchmachen und alles andere als physiologisch relevant sind (Stacey and MacDonald 2001).

Unter Verwendung von z.B. dem sehr starken Onkogen TAg können Nagerzellen effizient immortalisiert, aber leider auch transformiert werden (Vass-Marengo et al. 1986, Ahuja, Saenz-Robles and Pipas 2005), da es beide Tumorsuppressoren p53 (Rohaly et al. 2010) und pRB (De Luca et al. 1997, Wolf et al. 1995, Stubdal et al. 1997) inaktiviert und zu starken

chromosomalen Abberationen in dem Genom der primären Zellen führt. Das starke virale Onkogen E7 hingegen inaktiviert pRB, aktiviert die zelluläre Telomerase und kann schon in alleiniger Verwendung die Transformation von Zellen induzieren (Giarre et al. 2001, Dick and Dyson 2002, Zhang, Chen and Roman 2006a, Zwerschke and Jansen-Durr 2000). Mit Hilfe des schwachen Onkogens hTert (katalytische Untereinheit der humanen Telomerase) konnte eine sanftere Immortalisierung von humanen Fibroblasten erzielt werden, bei der die Zellen zwar immortalisiert wurden jedoch nicht transformiert (Horrocks et al. 2003, Bodnar et al. 1998). Jedoch funktioniert hTert nur für einige wenige Zelltypen und braucht meist die Unterstützung von weiteren Faktoren, wie z.B. c-Myc.

Generell muss zwischen immortalisierten und transformierten Zelllinien unterschieden werden (Strauss and Griffin 1990). Immortalisierte Zelllinien haben ihr Replikationslimit durchbrochen und weisen ein unbegrenztes exponentielles Wachstumsverhalten auf (Horrocks et al. 2003). Das gilt auch für transformierte Zellen, wobei diese im Gegensatz zu immortalisierten Zellen auch tumorigen sind und somit Tumore bilden können (Drayton and Peters 2002). Einzelne oder mehrere starke Onkogene werden dennoch eingesetzt, um überhaupt sicherzustellen, dass eine Immortalisierung erreicht werden kann (Linder and Marshall 1990, Vass-Marengo et al. 1986). Der Versuch, die unterschiedlichsten Zelltypen unter Verwendung fixer Kombinationen oder einzelner Gene zu immortalisieren ist dazu noch ineffizient. Die klassischen Methoden sind daher unflexibel, führen zu einem stark veränderten Phänotyp und funktionieren nur für einige wenige Zelltypen.

1.5 Das Endothelium

Endothelzellen werden verwendet um das vaskuläre System und seine degenerativen Veränderungen *in vitro* zu untersuchen. Ein weitreichenderes Verständnis von Aufbau und Funktion des Blutgefäßsystems trägt dazu bei, die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen besser zu verstehen und damit potentielle Möglichkeiten zu deren Prävention und Therapie zu eröffnen.

1.5.1 Das Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem stellt mit seiner Fläche von 1.000-7.000 m² eines der größten Stoffwechselorgane im menschlichen Körper dar. Das Blutgefäßsystem versorgt die Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff und entsorgt Abfallprodukte und Kohlendioxid. Das Blutgefäßsystem ist das erste sich entwickelnde Organ während der Embryogenese. Dabei wird die Embryogenese selbst in zwei streng nacheinander ablaufende Prozesse, die Vaskulogenese und die Angiogenese unterteilt.

1.5.1.1 Die Vaskulogenese

Im avaskulären Embryo kommt es durch die Vaskulogenese zu der Entwicklung eines primitiven Gefäßnetzwerkes. Dabei werden aus pluripotenten Stammzellen des Mesoderms Hämangioblasten gebildet, die dann Blutinseln ausbilden (Kume 2010). Mit Hilfe des VEGF-Rezeptor2 (Vascular-Endothelial-Growth-Factor Receptor2) differenzieren die Hämangioblasten zu hämatopoetischen Vorläuferzellen und Angioblasten (Ferkowicz and Yoder 2005). Der Angioblast differenziert unter dem Einfluss von VEGF und bFGF zu Endothelzellen, die im Embryo ein erstes primitives Gefäßnetz ausbilden (Risau 1995). Die Reifung in ein matures Gefäßsystem erfolgt dann durch die Angiogenese (Swift and Weinstein 2009).

Auch im adulten Stadium kann es zur Neovaskularisation, also der Vaskulogenese kommen (LaRue, Lansford and Drake 2003, Tepper et al. 2005). Dabei werden die neuen Gefäße meist in ischämischem Gewebe aufgrund von Hypoxie gebildet, also induziert durch akuten Sauerstoffmangel. Jedoch kommt es auch in manchen Fällen der Wundheilung zur Vaskulogenese.

1.5.1.2 Angiogenese

Im adulten Organismus dient die Angiogenese der Gefäßneubildung aus bereits existierenden Gefäßen (Potente, Gerhardt and Carmeliet 2011)(siehe auch 3.4.3.4). Dabei sind VEGF- und das Angiopoietin/Tie-2-System essentiell, die unter anderem durch den Sauerstoffpartialdruck und der Wandschubspannung reguliert werden (Adams and Alitalo 2007, Ferrara 2002). In einem gesunden gut perfundierten Gefäß werden weder VEGF, noch Angiopoietin-2 exprimiert. Kommt es jedoch zur Angiogenese, z.B. durch Hypoxie induziert, wird durch Stickstoffmonoxid die Vasodilatation existierender Gefäße vermittelt (Konisti, Kiriakidis and Paleolog 2012). Durch die Expression von VEGF wird Wachstum induziert und die Gefäßintegrität erniedrigt. Angiopoietin-2 verstärkt die Durchlässigkeit des Zellverbandes zusätzlich (Scharpfenecker et al. 2005). Unter der weiteren Einwirkung von VEGF und bFGF kommt es zur Migration einzelner Endothelzellen aus dem Zellverband in das umliegende Gewebe, also zu der Sprossung. Nach der Formation primärer vaskulärer Strukturen durch die Endothelzellen, kommt es zur Assoziation von glatten Muskelzellen (SMC=Smooth muscle cells) und Perizyten und letztendlich zur Reifung in ein matures Blutgefäß.

Angiogenese findet im adulten Organismus z.B. bei der Wundheilung und der Bildung der Plazenta statt. Das pathophysiologische Wachstum von Tumoren ist durch eine extensive Angiogenese charakterisiert.

1.5.2 Das Endothel

Das Endothel dient der strukturellen Trennung von Gefäßlumen und Gewebe. Es bildet somit eine Permeabilitätsgrenze und kontrolliert den Transport sowohl flüssiger als auch makromolekularer Komponenten aus dem Blutstrom über die Zellen in das umliegende Gewebe (Herbert and Stainier 2011). Diese selektive Permeabilität erfolgt über eine Reihe von Mechanismen und ist stark organspezifisch. In Kapillaren ist das Endothel oft fenestriert um eine schnelle Passage von großen Molekülen (z.B. in endokrinen Drüsen) oder großen Mengen an Flüssigkeit (z.B. Nieren) zu ermöglichen (Dejana 2004). Die Endothelzellen in Teilen des Gehirns sind im Vergleich nahezu impermeabel und bilden auf diese Weise die Blut-Hirnschranke (Abbott, Ronnback and Hansson 2006, Abbott et al. 2010). Das Endothel sorgt damit für die Aufrechterhaltung der Homöostase.

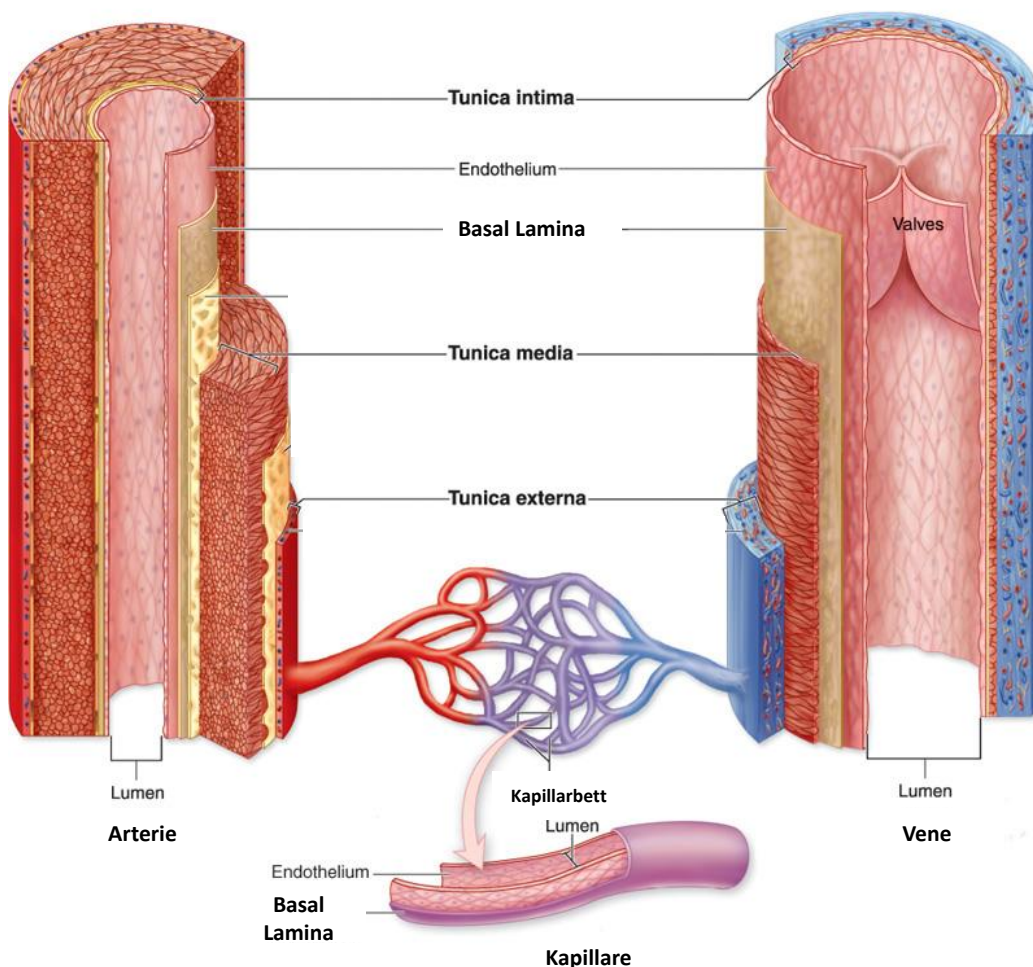


Abbildung 7: Aufbau und Struktur von Blutgefäßen

Die Tunica Intima ist ein Monolayer aus Endothelzellen, der von einer Basal Lamina umgeben ist. Die von Glattmuskelzellen gebildete Tunica Media kann, je nach arteriellem Durchmesser in großen Arterien vielschichtig ausgebildet und von starken elastischen Fasern und Bindegewebe umgeben sein. Die Tunica Externa wird aus starkem Bindegewebe gebildet. Bei Kapillaren im Kapillarnetz werden die Endothelzellen nur noch von einer Basalmembran umgeben. Verändert nach The McGraw-Hill-Company.

In Abbildung 7 ist der Aufbau von Blutgefäßen schematisch dargestellt. Eine einzellige Schicht von Endothelzellen bildet gemeinsam mit der Basallamina die Tunica Intima. Daran schließt sich nach außen hin die Tunica Media an, die je nach Durchmesser des Gefäßes und seiner Funktion aus wenigen bis mehreren Schichten Glattmuskelzellen (smooth muscle cells SMCs) bestehen kann. Die Tunica Media wird von der Tunica Externa umschlossen, die aus starkem Bindegewebe besteht, welches das Gefäß von dem umliegenden Gewebe abgrenzt und es gleichzeitig verankert (Hirashima and Suda 2006).

Das gesunde Endothel ist für viele physiologische Prozesse essentiell (Aird 2007b, Aird 2007a). Es kontrolliert z.B. den Gefäßtonus und Blutdruck über die Produktion vasodilatatorischer Faktoren wie Stickstoffmonoxid, Prostaglandine und EDRF (endothelium derived relaxing factor) oder vasokonstriktorischer Faktoren wie Angiotensin II, Endothelin und EDCF (Endothelium Derived Constricting Factor).

Des Weiteren steuert das Endothel die Blutgerinnung und Angiogenese. Während einer Inflammation kontrolliert es die Adhäsion von Neutrophilen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten und reguliert die Extravasation der Abwehrzellen in das umliegende Gewebe (Pober and Sessa 2007, Miyasaka and Tanaka 2004, Weber, Fraemohs and Dejana 2007). Des Weiteren ist das Endothel ein wichtiger Signalübermittler indem es Veränderungen im Blutstrom wahrnimmt und als Reaktion an die Gefäßwand weiterleitet. Solche Veränderungen beinhalten mechanische Reize (Dehnung und Strömungsverhältnisse), sowie die Konzentration vasoaktiver Substanzen und metabolischer Faktoren. Die Expression von Rezeptoren ermöglicht die Reaktion auf Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und Toxine.

1.5.3 Endothelzelltypen

Das Endothel wird morphologisch in kontinuierliches, fenestriertes und diskontinuierliches Endothel klassifiziert (Cleaver and Melton 2003, Aird 2007a). Jedoch variiert auch die molekulare Heterogenität von Endothelzellen verschiedener Gewebe (Chi et al. 2003, Yano et al. 2007). Das Endothel passt sich in den unterschiedlichen Organen und Geweben an die jeweiligen dort bestehenden Bedingungen an und daher rühren die Unterschiede bezüglich Morphologie, Struktur und Funktion der Endothelzelltypen. Zum Beispiel exprimieren nicht alle Endothelzelltypen die Weibel-Palade-bodies (Aird 2007a).

1.5.3.1 Humane Nabelschnur-Endothelzellen

Humane Nabelschnur-Endothelzellen (im Folgenden HUVEC = Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sind makrovaskuläre Endothelzellen von embryonalen Ursprung. Primäre HUVECs sind die häufigste Quelle von primären Endothelzellen. Sie sind im Vergleich zu

anderen humanen Endothelzellen einfach zu isolieren und weisen für eine primäre Zelle ein relativ hohes Proliferationspotential von circa 20 Populationsverdopplungen *in vitro* auf.

1.5.3.2 **Adulte humane mikrovaskuläre Endothelzellen**

Adulte humane mikrovaskuläre Endothelzellen (im Folgenden HMVEC = Human Microvascular Endothelial Cells) sind ausdifferenzierte Endothelzellen aus einem adulten Menschen. Primäre HMVECs weisen ein nur geringes Proliferationspotential *in vitro* auf, da es in einem gesunden adulten Organismus, außer während der Wundheilung, nur sehr geringe Notwendigkeit der Angiogenese gibt.

1.5.3.3 **Die Blut-Hirn-Schranke**

Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (im Folgenden BBB = Blood-Brain-Barrier) weisen sehr spezielle Charakteristika und Funktionen auf (Abbott et al. 2010, Ballabh, Braun and Nedergaard 2004, Bechmann, Galea and Perry 2007, Cecchelli et al. 2007). Die BBB stellt die physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem zentralen Nervensystem dar. Sie dient dem Schutz des Gehirns vor Pathogenen, Toxinen und Inflammationen (Glass et al. 2010). Die charakteristische Zusammensetzung und Anatomie der Tight-Junctions (Dejana 2004) der BBB Endothelzellen ermöglicht einen sehr selektive Transportprozesse über diese Barriere um das Gehirn mit Nährstoffen zu versorgen und Abfallprodukte zu entsorgen (Agarwal, Lippmann and Shusta 2010, Bechmann et al. 2007).

1.5.4 **Endotheliale Dysfunktion**

Die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen ist weltweit die häufigste Todesursache. Auslöser ist meist die Dysfunktion des Endothels durch erbliche Faktoren oder Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Fettleibigkeit, Rauchen, Bluthochdruck (Schermuly et al. 2011, Bakris 2012), Diabetes und Stress. Die chronische Schädigung von Endothelzellen führt z.B. zu einer veränderten Vasoreaktivität, erhöhter Gefäßpermeabilität für Plasmaproteine und selektive Hyperadhäsivität für Leukozyten und thrombotische Faktoren. Fehlfunktionen des Endothels führen zum Beispiel zu arterieller Hypertonie, venöse Thrombosen, Angina Pectoris, Krampfadern und erektiler Dysfunktion (siehe auch 4.6). Die wohl prominenteste kardiovaskuläre Krankheit ist die Arteriosklerose (Rocha and Libby 2009). Die Pathogenese der Arteriosklerose führt letztendlich zur Verhärtung und Verengung der Gefäße mit weitreichenden Folgen wie Thrombose, Ischämie, Herzinfarkt oder Schlaganfall (Weber and Noels 2011). Ein weiterer degenerativer Zustand arterieller Gefäße ist das Aneurysma (Frosen et al. 2012). Hier ist die Gefäßwand durch Krankheit oder genetische Disposition geschwächt und rupturgefährdet. Des Weiteren ist eine endotheliale Fehlfunktion bei vielen Immunerkrankungen beteiligt. Darüber hinaus ist die deregulierte Angiogenese eine

Begleiterscheinung von z.B. Tumorwachstum, Metastasierung, Retinopathie, rheumatoider Arthritis (Scott, Wolfe and Huizinga 2010), Makuladegeneration (Melnikova 2005) und Kollateralenbildung bei okklusiven Gefäßerkrankungen.

1.6 Ziel der Arbeit

Aussagekräftige physiologische endotheliale *in vitro* Testplattformen werden benötigt um die Wirkstoffentwicklung und Therapieevaluierung für Herzerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen zu unterstützen (Goldbard 2006, Eglén and Reisine 2011). Im Rahmen von solchen Entwicklungsprozessen ist es für Forschung und Industrie wichtig, mittels biologischer Testverfahren möglichst frühzeitig abzuschätzen, wie sich ein geplantes Produkt in Bezug auf Wirksamkeit, menschliche Gesundheit und die Umwelt auswirken wird (Eglén et al. 2008, Sterling et al. 2008). Auf Basis ökonomischer, wissenschaftlicher, gesellschaftlicher und rechtlicher Voraussetzungen besteht eine immer stärkere Notwendigkeit und der Wunsch zellbasierte *in vitro* Testverfahren als Alternative zu Tierversuchen einzusetzen. Ebenfalls werden Endothelzellen in der Forschung benötigt, um das vaskuläre System und seine degenerativen Veränderungen *in vitro* zu untersuchen. Zudem ist der Einsatz von Endothelzellen in der regenerativen Medizin und der Zelltherapie von hohem Interesse (z.B. Bypässe, Dauerzugänge bei Dialysepatienten, Vaskularisierung von künstlichen Geweben und Organen)(siehe Abschnitt 4.6).

Für die eben genannten Zwecke werden im Moment entweder klassische Zelllinien (Horrocks et al. 2003) oder primäre Zellen verwendet (Eglén et al. 2008). Den Engpass stellt dabei die Versorgung mit genügend Zellmaterial dar, dass die physiologischen Eigenschaften des nativen Zelltyps aufweist, um aussagekräftige reproduzierbare Erkenntnisse zu generieren, die möglichst nahe der *in vivo* Situation sind (Eglén and Reisine 2011, Goldbard 2006).

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Vorteile von klassischen Zelllinien (siehe 1.1.2) und primären Zellen (1.1.1) zu kombinieren und eine neue Kategorie von Zelllinien zu generieren, die zwar wie eine klassische Linie proliferieren, jedoch den primären Phänotyp des nativen Zelltyps behalten.

Dazu sollte in dieser Arbeit ein neues Immortalisierungsverfahren entwickelt werden. Dabei sollte besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, dass die neuen Zelllinien schnell und effizient generiert werden können und vor allem, dass die Zelllinien physiologisch relevant sind. Um dieses Ziel zu erreichen, sollte eine Screeningmethode nach essentiellen, zelltypspezifischen Genkombinationen entwickelt werden, die zum einen die Immortalisierung ermöglichen und zum anderen den physiologischen Phänotyp erhalten. Um die Genkombinationen zu selektieren, die die Proliferation der Zellen induzieren, dabei aber die ursprüngliche Funktionalität bewahren, sollten die generierten Endothelzelllinien einer Charakterisierung unterzogen werden. Dabei sollte die Expression endothel-spezifischer Marker und Funktionen im Vergleich zu dem Verhalten der entsprechenden primären Zellen evaluiert werden, um ihre physiologische Relevanz zu beurteilen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
- 20°C Gefrierschrank	Liebherr	
- 80°C Gefrierschrank	Thermo Forma	
4 °C Kühlschrank	Liebherr	
Autoklav	Belimed	Dampf Sterilisator 6 66 HS1
Cell Counter	Schaefer Systems	Casy-DT 1
Brutschrank	Labotect	C200
Kühlzentrifugen	Thermo Fisher, Sorvall Superspeed Minifuge	RC5
	Heraeus-Christ, Heraeus Biofuge fresco	GSA, GS3
	Inflexible rotors	SS32
	Swing rotor	HB4
Durchflusszytometer	BD Bioscience	FACS Aria
	BD Bioscience	FACS Calibur
Gelelektrophoresekammer	Gibco BRL Horizontal Gel 58	Electrophoresis Apparatus 20.25
Mikropipetten	Gilson	
Mikroskope	Nikon	TMS
	Olympus	CK2
	Olympus	BX51
PCR- Maschine	Biometra	T3 Thermocycler
Photometer	Nanodrop Spectrophotometer, Peqlab	ND-1000
Power Supplies	Gibco BRL	504
	Phero-stab, Bachofer	300
	Biorad Power Pac	300
	Desaga Mains Power supply	1200/200
Sterile Werkbänke	Steril Gard Class II Type A/B3, Baker Company	SG 400E
	HeraSafe, Heraeus	HSP 18
Tischzentrifugen	Eppendorf	
	Heraeus Biofuge	
	Heraeus Christ Minifuge GL Hettich	
	Rontana/S	
Thermomixer	Eppendorf	5436
UV-Kammer	Hanau	
Vortexer	Vortex Scientific Industries	Vortex Genie 2
Wasserbad	GFL	

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Cat.-Nr.
BD Matrigel Basement Membrane matrix	BD Bioscience	354234
BD Matrigel Basement Membrane matrix growth factor reduced	BD Bioscience	354230
BD Matrigel Basement Membrane matrix high concentration growth factor reduced	BD Bioscience	354263
DAF-2-DA		
4,5-Diaminofluorescein diacetate cell permeable	Alexis Biochemicals	ALX -620-056
Human TNF alpha Recombinant Protein	eBioscience	14-8329
acetylated low-density lipoprotein from human plasma, BODIPY® FL conjugate (BODIPY® FL AcLDL)	Molecular Probes/Invitrogen	L3485
Collagenase H	Roche	11 074 059

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Cat.-Nr.
Anti-human CD31 PECAM1 antibody produced in rabbit, polyclonal	Sigma	HPA004690
Anti-Human CD106 (VCAM-1) PE	eBioscience	12-1069
Anti-Human CD54 (ICAM-1) PE	eBioscience	12-0549
Anti-Human CD62E (E-Selectin) PE	eBioscience	12-0627
Anti-Human Tie 1	Abcam	ab 27851
Anti-Human Tie2	BD Pharmingen	557039
Anti-Human CD 309	BD Pharmingen	560494

Verwendete Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Amersham Biosciences, Bayer, Biolabs, Bioline, Biorad, BRL Difco, Gibco, Merck, Miles, Pharmacia, Prenner, Qiagen, R&D Systems, Roche, Seromed, Serva and Sigma.

2.1.4 Enzyme

Verwendete Enzyme wurden von folgenden Herstellern bezogen:

New England BioLabs, Roche, Bioline, Amersham Biosciences, GE Healthcare und Invitrogen.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

In dieser Arbeit wurden Verbrauchsmaterialien folgender Firmen verwendet:

BD Falcon, Nunc, Corning, Eppendorf, Sarstedt, Greiner, Biozym, Star Labs

2.1.6 Oligonukleotide und Sequenzierung

Oligonukleotide wurden von MWG bezogen. Sequenzierungen wurden von der Abteilung "Genom Analyse" von Dr. Helmut Blöcker am HZI durchgeführt.

2.1.7 Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Acrobat 9.3.4	Adobe Systems
Adobe Photoshop CS	Adobe Systems
Axio Vison 3.1	Zeiss; Göttingen
CellQuest Pro 4.0.2	Becton Dickinson
FACSDiva	Becton Dickinson
FlowJo 7.5	Tree Star
Office 2003/2007	Microsoft
Vector NTI Advance 10	Invitrogen
Chromas 2.32	Technelysium Pty Ltd
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgibiu/primer3/primer3_www.cgi .
GeneSpring GX 11.0	Agilent Technologies Inc.

2.2 Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurden mit Ladepuffer versehene DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihres relativen Molekulargewichtes aufgetrennt. Zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90 - 110 V für 30 - 60 min in 1x TAE-Puffer. Als Größenstandard diente der „Hyperladder I“ (Fermentas). Für die Detektion der DNA wurde das Agarosegel anschließend für ca. 20 min in

einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und unter UV-Belichtung (360nm) mit einer Videokamera (GelDoc, BioRad) fotografiert.

Materialien	
1 x TAE-Puffer	40mM Tris/Acetat (pH 7.5)
	20mM NaOAc
	1mM EDTA
5 x Ladepuffer	15% Ficoll
	50mM EDTA
	1 x TAE
	0,05% Bromphenolblau
	0,05% Xylencyanol

2.2.1.1 DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen

Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen zu gewinnen, wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und laut Hersteller-Protokoll mit Hilfe des Kits "QIAquick" Gel-Extraktion Kit (Qiagen) aufgereinigt.

2.2.2 Restriktionsanalyse

Um die DNA zu schneiden, wurden die Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller (NEB) vorgeschlagenen Bedingungen (Puffer/Temperatur) verwendet. Die Reaktion wurde durch Hitze-Inaktivierung gestoppt (20min bei 65°C/80°C).

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde das „Expand Long Template PCR System“ von Roche verwendet, das über eine 3'-5' Exonuklease oder „proof-reading“ Aktivität verfügt. Die Primer für die DNA-Synthese wurden von MWG bestellt.

Standard PCR-Reaktion	
PCR Puffer 2 (10 x konz.)	4,5µl
10 (pmol/µl) Forward Primer	2 µl
10 (pmol/µl) Reverse Primer	2 µl
10mM dNTP Mix(10mM von jedem dNTP)	2.5µl
DMSO	1 µl
DNA Polymerase mix (Roche) (3.75 U)	0.75 µl
DNA Template	
ddH ₂ O ad 50µl	

Standard PCR-Programm		
Temperatur	Dauer	Schritt
1. 95°C	5 min	Initiale Denaturierung
2. 95°C	30 sek	Denaturierung
3. 55-58°C	45 sek	Annealing
4. 72°C	90 sek	Elongation
5. 72°C	10 min	Finale Elongation
6. 4°C		Pause
die Schritte 2-4 werden 30 mal wiederholt		

In Tabelle 1 sind die erwarteten Fragmentgrößen der PCR-Produkte der entsprechenden Expansionsgene der Genbank aufgelistet. In Abbildung 8 ist beispielhaft ein Foto einer durchgeführten PCR-Analyse der HMVEC-Linie I46-12 dargestellt. Diese Zelllinie konnte erzielt werden, indem die primären Zellen mit der kompletten Immortalisierungsbank infiziert wurden. Um anschließend festzustellen, welche der 33 Immortalisierungsgene in das Genom der primären Zellen integrierten, wurde für jedes der 33 Gene eine PCR unter Verwendung der spezifischen Primer durchgeführt. In Abbildung 8 sind die ersten 29 PCR-Analysen auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Dabei konnte, wie in der Abbildung zu sehen, ein Subset von fünf im Genom integrierten Immortalisierungsgenen detektiert werden. Dabei handelt es sich um ID2, Fos, TAg, ID3, und E7.

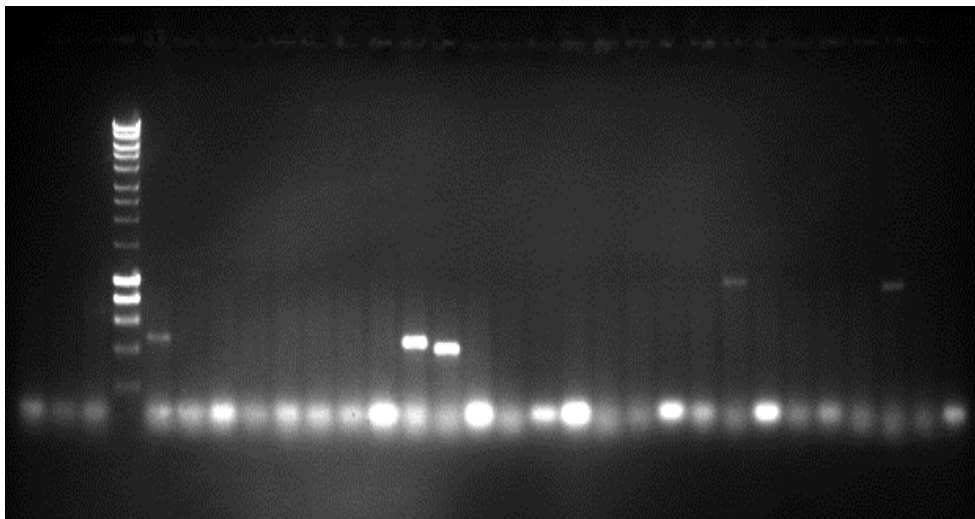


Abbildung 8: Beispiel eines 1% Agarosegels der ersten 29 PCR-Analysen der Linie I46-12

Zur Infektion der Zelllinie I46-12 wurden die gesamte Lentiviren-Genbank verwendet und die Integration der entsprechenden Immortalisierungsgene in das Genom der Linie mittels Verwendung spezifischer Primer in der PCR überprüft. Auf dem Gelfoto sind die ersten 29 aufgetragenen PCR-Analysen zu sehen, mit Hilfe derer die Integration der Gene ID2, Fos, TAg, ID3, und E7 detektiert werden konnte.

Tabelle 1: Fragmentgrößen der PCR-Produkte der entsprechenden Gene der Immortalisierungsgenbank

Nr.	Gene	Fragmentgröße
1	Id2	462bp
2	Fos	1054bp
3	NS1	678bp
4	Jun	912bp
5	E2F1	944bp
6	βCat	806bp
7	TAg	1214bp
8	Myb	780bp
9	Id3	453bp
10	E7	404bp
11	E6	636bp
12	Bcl2	440bp
13	HoxA9	515bp
14	Bmi1	782bp
15	PymT	606bp
16	Core	487bp
17	Oct3	846bp
18	Klf4	1084bp
19	Id1	980bp
20	Myc	1001bp
21	Lmo2	822bp
22	Nfe2L2	1008bp
23	Yap1	950bp
24	Nanog	935bp
25	Sox2	846bp
26	RhoA	562bp
27	Ezh2	1481bp
28	Gli1	1144bp
29	v-Myc	1052bp

2.2.4 Isolation genomischer DNA aus Säuger-Zellen

Materialien	
Modified Bradley's Lösung	10mM Tris/HCl (pH 7.5)
	2mM EDTA
	10mM NaCl
	0,5% SDS
	1mg/ml Proteinase K
NaAc/Ethanol	75mM Natriumacetat in Ethanol

Die Zellen einer konfluenten 6-well-Platte wurden mit PBS gewaschen und 0,5ml Modified Bradley's für 1min hinzugefügt. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1ml eiskaltes NaAc/Ethanol hinzugegeben und die DNA bei Raumtemperatur für zwei Stunden präzipitiert. Danach wurde die Lösung einige Male gewendet und zentrifugiert (5000rpm, 5min) um die DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, 0,5ml kaltes 70%iges Ethanol hinzugefügt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde dieser Waschschritt wiederholt. Das Pellet wurde dann getrocknet und anschließend in 30-50µl ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.5 Präparation eukaryotischer RNA

Die Zellen wurden geerntet und die RNA mithilfe des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert. Die geernteten Zellen wurden 5min bei RT und 300xg pelletiert und in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Scherung aufgeschlossen. Dazu wurde die Lösung mindestens 10 x durch eine Kanüle (20G Nadel) pipettiert. Anschließend wurde die Probe auf eine Silica-Säule gegeben und die restliche genomische DNA mittels DNase verdaut. Die RNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und 2 x mit 50 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.5.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung

Die RNA wurde genutzt um sie auf einem Affymetrix Chip zu hybridisieren. Dazu ist es essentiell die Konzentration der RNA genau zu bestimmen, da mindestens 1 µg und optimaler Weise 3 µg RNA benötigt wurden. Die Konzentrationsbestimmung wurde jeweils vor der Fällung der RNA durchgeführt. Da bei diesem Vorgang jedoch wiederum RNA verloren geht, wurden die Proben vor der Verarbeitung für den Chip nochmals mithilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits (Agilent Technologies) auf RNA-Qualität und -Quantität überprüft. Die RNA-Proben wurden 1:160 mit RNase-freiem H₂O verdünnt und die OD₂₆₀ gegen H₂O als Referenz gemessen. Um die eventuelle Kontamination durch Proteine zu bestimmen wurde ebenfalls die OD₂₈₀ gemessen. Aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ lässt sich die Reinheit der RNA bestimmen. Der Wert sollte bei reiner RNA bei 2,0 liegen. Befindet er sich darunter so ist die Probe möglicherweise mit genomischer DNA oder Proteinen verunreinigt. Ein Wert von OD₂₆₀ = 1 entspricht 40 µg/ml RNA. Die Konzentration lässt sich demnach folgendermaßen berechnen: Konzentration [µg/ml] = OD 260 × 40 µg/ml × Verdünnungsfaktor.

2.3 Kultivierung von Säuger-Zellen

Medien und Medienzusätze	
100 x Glutamin	29,23 mg/ml Glutamin (sterilfiltriert und bei –20°C gelagert)
100 nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco
100 x Pen/Strep	6,06mg/ml ampicillin (10,000 U/ml) 10mg/ml streptomycin pH 7.4 (sterilfiltriert und bei –20°C gelagert)
1000 x β -Mercaptoethanol	100mM β -mercaptoethanol, 7,014 μ l/ml in ddH ₂ O (sterilfiltriert und bei –20°C gelagert)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	13,63 g/L DMEM Puder (Sigma) 3,67 g/L (44mM) NaHCO ₃ 2,6g/L 10mM HEPES pH 7,2
FCS (Fetal Calf Serum)	Biowest
G418	100mg/ml G418 in ddH ₂ O (sterilfiltriert und bei –20°C gelagert)
Gelatine-Lösung	2% stock solution Type B (Sigma) zu 0,5% (w/v) mit PBS verdünnt bei 4°C gelagert
PBS	PBS 140mM NaCl 27mM KCl 7,2mM Na ₂ HPO ₄ 14,7mM KH ₂ PO ₄ pH 6.8-7.0
TEP (trypsin EDTA)	6mM EDTA 0,1 % trypsin (Gibco) in PBS

Verwendete Zellen und Zelllinien	
HEK293T	Human embryonal kidney Zelllinie, ATCC number CRL 11268
NIH/3T3	Embryonic mouse fibroblast (MEF) Zelllinie, ATCC CRL 1658
HMVEC Primäre humane mikrovaskuläre Endothel-Zellen	Promocell, Lot. Nr. 8052802.9
HUVEC Primäre humane Nabelschnur Endothel-Zellen	ProVibro GmbH, Lot. Nr. Provibro 2015SC

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden auf Kulturflaschen oder Platten ausgesät und in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂, 20 % O₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig von der Konfluenz der Zellen wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen passagiert. Für die Passagierung wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und durch schütteln von der Oberfläche entfernt. Die Zellsuspension wurde in Medium aufgenommen um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen wurden gezählt und in der gewünschten Konzentration in ein neues Kulturgefäß übertragen. Um die Zellzahl zu bestimmen wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Hilfe des CASY-1 DT Zell-Zählers (Schaerfe Systems, Germany) gezählt.

2.3.2 Kultivierung humaner Endothelzellen

Die HUVECs wurden in Endothelzellen Basal-Medium EBM (Lonza; EGM BulletKit Cat.no. CC-3124 (bestehend aus Cat.no. CC-3121 (basal media) und Cat.no. CC-4133 (Supplements und Wachstumsfaktoren (Bovine brain extract (BBE), Hydrokortison, hEGF, FBS und Gentamycin/Amphotericin)) kultiviert. Das Endothelial Cell Growth Medium MV (Lonza; EGM-2 BulletKit (Cat.no. CC-3156 & Cat.no. CC-4176)) wurde für die Kultivierung der HMVECs verwendet, unter Zugabe der entsprechenden Supplements. Alle Endothelzellen wurden auf gelatinisierten Zellkulturplatten kultiviert. Dazu wurden die Zellkulturplatten mit Gelatine-Lösung (2% Stock-Lösung Typ B Gelatine (Sigma) zu 0,5% (w/v) mit PBS verdünnt; bei 4°C gelagert) beschichtet und für 30 min in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Zellen ausgesät.

2.3.3 Lentivirus-Produktion und Infektionsprozedur

Die Produktion lentiviraler Vektoren wurde durch die transiente Transfektion von vier Helferplasmiden und der entsprechenden Expressionskassette in HEK293T Zellen durchgeführt, wie zuvor in May *et al.* 2007 (May, Hauser and Wirth 2007) beschrieben. Auf einer mittleren Kulturplatte wurden dazu 5x10⁶ HEK293T Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Helferplasmide pLP1 (gag/pol), pLP2 (rev), pLP/VSVg (VSVg) und das entsprechende Expressionsplasmid in eine wässrige 2,5M CaCl₂ Lösung gegeben. Anschließend wurde diese DNA-Lösung unter ständigem vortexen tropfenweise in eine HEBS Lösung (280mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 7,1; aliquotiert und bei -20°C gelagert) gegeben. Die DNA-HEBS-Lösung wurde dann auf die mit frischem Medium beschichteten HEK293T Zellen gegeben und die Zellen über Nacht kultiviert. In den beiden folgenden Tagen wurde der Virusüberstand geerntet, filtriert und bei -80°C gelagert. Mit Hilfe von NIH3T3 Zellen wurde anschließend der Titer des geernteten Virusüberstandes bestimmt, der 1x10⁵ infektiöse Partikel pro Milliliter beträgt. Die Infektion der primären Endothelzellen wurde durchgeführt, wenn die Zellen eine Konfluenz von 70–80% erreicht

hatten. Vor der Infektion wurden Mastermixe der in HEK293T Zellen produzierten Lentivirus-Überstände angefertigt, wobei innerhalb des Mastermixes jeweils das gleiche Volumen der entsprechenden Viren dem Mix zugesetzt wurden. Diese Mastermixe enthielten entweder die gewünschte Kombination an unterschiedlichen, für die gewünschten Expressionskassetten kodierenden Lentiviren oder sie bestanden aus der kompletten Lentivirus-Bank (siehe Tabelle 2). Diese Mastermixe wurden 1:1 mit normalem Kulturmedium gemischt, 8µg/ml Polybren hinzugefügt und zur Infektion bereitgestellt. Das Medium wurde von den primären Zellen abgenommen und sie wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Lentivirus-Medium-Mastermix auf die Zellen gegeben und dort zur Transfektion der gewünschten Expressionskassetten für acht Stunden belassen. Bei jeder Transfektion wurde parallel zu den Infektionen ein Well an primären Zellen zur Kontrolle uniniziert belassen. Nach acht Stunden wurde der Virusüberstand entfernt und durch normales Kulturmedium ersetzt. Drei Tage nach Infektion wurde eine Selektion mit Hilfe von 0,4mg/ml G418 durchgeführt, bis die Zellen der uninizierten Kontrolle gestorben waren. Die daraus resultierenden Infektionen wurden weiter expandiert und analysiert.

2.3.4 Kryokonservierung und Auftauen von Säuger-Zellen

Einfriermedium
90%FCS + 5%DMSO

Das Medium wurde von den Zellen entfernt, sie wurden mit PBS gewaschen, mit TEP geerntet und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000rpm, 5min), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (Corning) überführt und diese in eine „Mr. Frosty“-Box (Nalgene) gestellt. Diese Box enthält Isopropanol und ermöglicht das langsame und schonende Einfrieren von Zellen. Die „Mr. Frosty“-Box wurde für 1-2 Tage in einem Gefrierschrank (-80 °C) aufbewahrt und anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die eingefrorenen Zellen wieder aufzutauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstoff in ein Wasserbad (37 °C) gelegt. Sofort nach dem Auftauen wurden die Zellen in 5 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und zentrifugiert (1000rpm, 5min). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen auf Kulturgefäßen ausgesät.

2.4 Charakterisierung der Endothel-Zellen

2.4.1 Populationsverdopplung

Die Populationsverdopplung (Populationdoubling = PDL) ist ein intrinsisches Maß für das „Alter“ von Zellen in Kultur. Eine untransformierte Zelle in Kultur hat eine begrenzte Lebensdauer, die sich in der Anzahl, der von ihr erreichten Populationsverdopplungen messen lässt. Dabei bezieht sich die kumulative PDL (kumPDL) auf die totale Anzahl der Teilungen, die eine Zellpopulation seit dem Zeitpunkt ihrer primären Isolation in vitro durchgeführt hat. Die Formel zur Berechnung der kumPDL lautet:

$$\text{PDL} = 3.32(\log^*(\text{Zahl der geernteten Zellen}/\text{Zahl der ausgesäten Zellen}))$$

2.4.2 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting = FACS) werden mit Antikörpern (Fluorophor-gekoppelt) gefärbte Zellsuspensionen analysiert. Diese werden in einem laminaren Strom vereinzelt und die Fluorophore in der Messkammer des Zytometers durch einen Laserstrahl angeregt. Das emittierte Licht wird mit einem System von Farbteilern und -filtern in verschiedenen Photodetektoren gemessen und in digitale Daten umgewandelt. Ebenfalls lassen sich durch die Absorption und Streuung des Laserlichtes Rückschlüsse auf die Größe (Forward Scatter, FSC) und Granularität (Side Scatter, SSC) der Zellen ziehen. Die Auswertung erfolgte zunächst über die Größe und Granularität der Zellen im FSC/SSC-Diagramm und anschließend entweder über die emittierte Fluoreszenz im Histogramm (Einzelsignal) oder im DotPlot (Doppelsignal). Schwellenwerte für positive Ereignisse wurden anhand ungefärbter Zellen ermittelt, um zwischen Hintergrund- und Signalfluoreszenz zu unterscheiden.

2.4.2.1 Immunologische Färbung von endothelspezifischen Oberflächenmarkern

(CD31, CD309, TIE1, TIE2, VEGF1, VEGF2)

Die Analyse der endothelspezifischen Oberflächenmarker wurde mit Hilfe von Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Antikörper (1:100 verdünnt in FACS-Puffer (PBS mit 2 % FCS)) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Dabei wurde jeweils ein Well des entsprechenden Zelltyps als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach Inkubation wurden die Zellen mehrfach mit FACS-Puffer gewaschen und im FACS analysiert.

2.4.2.2 Immunologische Färbung von endothelspezifischen Inflammations-abhängigen Oberflächenmarkern (CD54, CD62, CD106)

Für dieses Experiment wurden für jede zu untersuchende Zelllinie oder primäre Zelle, je drei Wells ausgesät. Das erste ist die unbehandelte Kontrolle, das zweite wird nicht mit TNF α stimuliert aber mit dem Antikörper gefärbt und das dritte wird sowohl mit TNF α stimuliert als auch anschließend mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt. Die Zellen, die stimuliert werden sollten, wurden mit PBS gewaschen und mit 25ng/ml TNF α in Medium für vier Stunden inkubiert, um die Expression der Inflammations-abhängigen Oberflächenmarker zu stimulieren. Nach den vier Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit einer 1:100 Verdünnung des entsprechenden PE-konjugierten Antikörpers für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mehrfach mit FACS-Puffer gewaschen und im FACS analysiert.

2.4.2.3 Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein

Um die Aufnahme der Zellen von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein (acLDL) zu untersuchen, wurden die Zellen gewaschen und für vier Stunden mit 2 μ g/ml FITC-konjugiertem acLDL (acetylated low-density lipoprotein from human plasma, BODIPY[®] FL conjugate (BODIPY[®] FL AcLDL); Molecular Probes/Invitrogen) verdünnt in Medium, im Dunkeln inkubiert. Für jede zu untersuchende Linie oder primäre Zelle wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und im FACS analysiert.

2.4.2.4 Untersuchung der endothelialen NO-Synthase-Aktivität

Bei diesem Experiment wird die Aktivität der endothelialen NO-Synthase-Aktivität (eNOS) indirekt über die von ihr produzierte Menge an NO evaluiert. Der nicht-fluoreszierende Farbstoff DAF-FM-diacetate (DAF-2-DA (4,5-Diaminofluorescein diacetate), cell permeable; Alexis Biochemicals) wird dabei durch das produzierte NO in seine fluoreszierende Form DAF-FM umgewandelt. Der Hersteller gibt dabei eine Verdünnung von 1:1000 als spezifisch für Endothelzellen an. Vorversuche ergaben jedoch, dass unter diesen Bedingungen auch andere Zelltypen positiv gefärbt werden. Um die Spezifität dieses Versuchs für Endothelzellen festzulegen, wurden mehrerer Zelltypen und unterschiedliche Versuchsbedingungen evaluiert. Dazu wurden humane (FS4LTM) und murine (NIH3T3) Fibroblasten-Zelllinien und primäre Endothelzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von DAF-2-DA für unterschiedliche Zeiträume behandelt. Schließlich konnten die Bedingungen gefunden werden, unter denen dieser Versuch spezifisch für Endothelzellen ist. Dabei wurden die Zellen mit einer 1:5000 Verdünnung von DAF-2-DA in FACS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und im FACS analysiert.

2.4.2.5 Messung des Trans-endothelialen Widerstandes

Die Messung des Trans-endothelialen Widerstandes (TEER) gibt Auskunft über die Integrität des endothelialen Zelllayers. Der TEER-Wert (in Ω/cm^2) hängt dabei von der gemessenen Ladung an zwei Elektroden ab zwischen denen sich der Zelllayer befindet, und reflektiert die Menge an Elektronen die durch den Zelllayer fließen. Je größer der gemessene Widerstand desto dichter ist die endotheliale Barriere und somit der Zell-Zell-Kontakt, ermöglicht durch die Ausbildung von Tight-Junctions. Die Messung wurde unter Verwendung des EVOMX Voltohmmeters (World Precision Instruments) und der EndOhm (World Precision Instruments) Messkammer vorgenommen. Die Endothelzellen wurden auf gelatinisierten Transwell-Membranen (Corning Incorporated; Costar Transwell 3,0 μm Polycarbonate Membrane, 6,5mm Insert, 24 well) kultiviert und über mehrere Tage gemessen. Für jede zu untersuchende Zelllinie oder primäre Zelle wurden auf je drei Membranen je 2×10^5 Zellen ausgesät und die Messung immer in Triplikaten vorgenommen. Als Negativ-Kontrolle wurde bei jeder Messung eine gelatinisierte Membran ohne Zellen vermessen. Aus der Messung der Triplikate wurde der Mittelwert gebildet, von dem dann anschließend der gemessene Wert der Negativkontrolle subtrahiert wurde, um den wahren Widerstand der Endothelzellen zu bestimmen.

2.4.3 Angiogenese

2.4.3.1 Untersuchung der Angiogenese *in vitro* - Matrigel-Assay

Mit Hilfe des Matrigel-Assays wird die Fähigkeit von Endothelzellen untersucht, gerichtet zu migrieren, sich aneinander zu lagern und in kapillar-ähnliche Strukturen zu differenzieren. Das Matrigel ist dabei ein Extrakt der murinen Basalmembran aus dem Maus-Engelbert-Holm-Schwarm Sarkom und enthält Laminin, Kollagen, Heparin-Sulfat und Proteoglycan, verarbeitet in einer sterilen Lösung. Bei 4°C ist es flüssig und bei 37°C semisolid. Das hier verwendete Matrigel (Becton Dickinson; BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, 10 ml *LDEV-Free Cat.no.354234) wurde schnell in flüssiger Form in 96-Wells pipettiert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde auf die semisolide Oberfläche 4×10^4 Zellen pro Experiment gegeben und weiterhin im Brutschrank inkubiert. Bereits nach einigen Stunden (2-8h) konnte die Ausbildung von kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet werden, die mit Hilfe des Mikroskops untersucht und dokumentiert wurden.

2.4.3.2 Untersuchung der Angiogenese *in vivo*

2.4.3.2.1 Generierung von endothelialen Spheroide

Endotheliale Spheroide einer definierten Zellzahl wurden, wie bereits von Korff *et al.* (Korff, Krauss and Augustin 2004) beschrieben generiert. Endothelzellen werden in Kulturmedium mit 0.25% (w/v) Methylzellulose über Nacht in hängenden Tropfen kultiviert. Unter diesen Konditionen formt sich aus den suspendierten Zellen ein einzelner Spheroide mit definierter Zellzahl von 10^2 , 10^3 oder 10^4 Zellen pro Tropfen.

2.4.3.2.2 Subkutane Injektion der Spheroide in Mäuse

Wie in Laib *et al.* (Laib et al. 2009) beschrieben, wurden die Spheroide geerntet, mit Medium gewaschen, zentrifugiert und mit 500µl Matrigel (growth factor reduced; BDBiosciences) und Fibrinogen (2 mg/ml finale Konzentration; Calbiochem) mit den Wachstumsfaktoren hVEGF und bFGF2 (je 500ng/ml) gemischt. Dieses Gemisch wurde subkutan in die Flanken von 8-12 Wochen alten RAG-2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen injiziert. Die Matrigelplugs wurden nach 14 Tagen re-isoliert und für die morphologische Analyse über Nacht in Histofix fixiert.

2.4.4 Tumorigenität

2.4.4.1 Tumorigenität *in vitro* – Softagar-Assay

Die Fähigkeit zum Wachstum ohne die Verankerung auf einer Oberfläche ist ein Indikator für die Tumorigenität von Zellen und kann mit Hilfe des Softagar-Assays evaluiert werden. Primäre Zellen sind nicht in der Lage ohne Anhaftung auf einer Oberfläche zu wachsen, tumorigene Zellen hingegen schon. Die Zellen werden in Softagar suspendiert, wobei 4×10^3 Zellen in 50 µl 0,3% Overlay-Agar in Mikrotiter-Platten ausgesät werden, die vorher mit 50 µl 0,6% Underlay-Agar beschichtet wurden. Die Zellen werden durch regelmäßige Zugabe von 50 µl Medium pro Well für zwei bis drei Wochen kultiviert und die Kolonien gezählt.

2.4.4.2 Tumorigenität *in vivo*

Die in dieser Arbeit generierten Endothelzelllinien wurden in Bezug auf ihre Tumorigenität *in vivo* untersucht. Dazu wurden pro Experiment 3×10^6 Zellen der entsprechenden Linie in 200µl PBS subkutan in die Flanke von RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen injiziert. Für die Injektion der Zellen wurden die Mäuse mit Hilfe von 2,5% Isofluran anästhesiert und eine 26G Kanüle verwendet. Tumorigene Zelllinien, wie z.B. CT-26HA bilden unter diesen Bedingungen bereits nach 2 Wochen in der Maus deutlich sichtbare Tumore. Die Mäuse wurden alle zwei Tage in

Bezug auf eine Tumorformation untersucht. Die Mäuse wurden geopfert, sobald die Tumore einen Durchmesser von 1cm überschritten hatten.

2.4.4.3 Karyotyp-Analyse

Die Analyse wurde am Institut für zelluläre und molekulare Pathologie an der MHH durchgeführt. Um die in dieser Arbeit generierten Endothelzelllinien zu untersuchen wurden die Standardtechniken der Karyotypisierung angewendet. Dazu wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60% kultiviert und zur Analyse versendet. Der Arrest der Chromosomen in der Metaphase der Zellen wurde mit Hilfe von Colcemid (Endkonzentration 0,02 µg/ml) für 2,5 Stunden, gefolgt von der enzymatischen Dissoziation durch Trypsin und der Behandlung mit 1% Natriumcitrat bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Metaphase Zellen wurden mit einer Mischung aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1 für 30 min fixiert. Die Objektträger wurden angefertigt, getrocknet und eine Giemsa-Färbung laut der standard-zytogenetischen Technik durchgeführt. Chromosomale Abberationen wurden identifiziert und laut Internationalem System der humanen Zytogenetischen Nomenklatur, ISCN (1995) bezeichnet.

2.4.5 Transkriptom-Analyse

Die Expressionsanalysen der isolierten Gesamt-RNA (siehe auch 2.2.5 und 2.2.5.1) wurden mit Hilfe des Affymetrix GeneChip® HG-U133 Plus 2.0 von der Array-Facility des HZI durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Transkriptom des gesamten Organismus betrachtet.

Kurzbeschreibung der Grundlage:

Mittels Photolithographie werden synthetische Oligonukleotid-Sonden in situ auf den Array aufgebracht, welche jeweils mit einem Teilstück eines Transkriptes hybridisieren. Wobei jedes Gen von 11 bis 20 25-mer Sonden repräsentiert wird. Diese SONDENSets wiederum bestehen aus perfect-match und miss-match Oligonukleotiden, um nicht-spezifische Bindungen zu minimieren. Der humane HG-U133 Plus 2.0 Array analysiert 47000 Transkripte mit 54000 Sonden Sets gleichzeitig. Die zuvor präparierte und fragmentierte Proben-RNA wird mit Fluoreszenz-Tags markiert und anschließend auf den Array gegeben. Die komplementären Bereiche zwischen Proben-RNA und Sonde hybridisieren und geben später beim Scannen des Arrays mit einem Laser ein Fluoreszenzsignal. Wobei die Stärke des Signals proportional zur Expressionsmenge der mRNA ist. Die Signale werden von einer Kamera aufgezeichnet und in einen digitalen Wert umgewandelt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Gene Spring Software (Agilent Technologies) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Innovative Strategie zur Etablierung physiologisch relevanter Säugerzelllinien

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer neuen universell einsetzbaren Methode zur Etablierung von neuen Zellsystemen. Mit Hilfe dieser Methode sollen Zelllinien unterschiedlichster Zelltypen generiert werden können, unabhängig des Alters und Genotyps des Spenders der primären Zellen. Im Unterschied zu anderen Immortalisierungsmethoden sollte hierbei jedoch die Funktionalität und der Phänotyp der Ursprungszellen nach Immortalisierung erhalten bleiben. Somit sollten die resultierenden Zelllinien zum einen eine robuste Proliferation aufweisen und zum anderen, sich wie die entsprechenden primären Zellen verhalten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein neuer Immortalisierungsansatz entwickelt, der zunächst im Folgenden erläutert wird, bevor die Zellliniencharakterisierung detailliert beschrieben wird.

3.2 Aufbau und Transduktion der Immortalisierungs-Genbank

Aufgrund der Hypothese, dass für eine effiziente und funktionelle Immortalisierung von primären Zellen erstens, die Aktivität von mehr als nur einem Gen benötigt wird und zweitens, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Genkombinationen benötigen, wurde ein Repertoire von 33 Immortalisierungsgenen definiert (siehe Tabelle 2). Diese 33 Gene wurden ausgewählt, da sie alle eine wichtige Rolle in der Kontrolle und Regulierung des Zellwachstums spielen und somit zu einem Immortalisierungsprozess beitragen können. Sie sind in Prozesse involviert, wie zum Beispiel der Kontrolle des Ablaufs des Zellzyklus, der Inhibierung von Apoptose, das Aufrechterhalten von Stammzell-Eigenschaften, oder dass sie dafür bekannt sind, unter bestimmten Bedingungen zu einer Immortalisierung führen zu können, oder dass ihre Expression während der Tumorigenese hochreguliert ist.

Um einen effizienten Transfer der Onkogene, ihr stabiles Integrieren und Exprimieren in der Wirtszelle zu gewährleisten, wurden diese in lentivirale Vektoren implementiert. Im Gegensatz zu anderen Retroviren können Lentiviren selbst sich nicht-teilende Zellen infizieren, da sie die Kernhülle aktiv überwinden können um in das Wirtsgenom zu integrieren. Die in dieser Arbeit zur Transduktion verwendeten Viren sind HIV-1 basierte, selbst-inaktivierende Lentiviren der dritten Generation (Überblick in (Delenda 2004)).

Tabelle 2: Genbank der zur Immortalisierung verwendeten Gene

Nr.	Trivial	Gen-ID	Gen-Titel	Spezies
1	Id2	3398	DNA-binding protein inhibitor ID-2; Inhibitor of differentiation 2	<i>Homo sapiens</i>
2	c-Fos	2353	FBJ murine osteosarcoma viral (v-fos) oncogene homolog	<i>Homo sapiens</i>
3	NS1	956533	PTPN11 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	<i>Influenza Virus</i>
4	Jun	3725	Jun activation domain binding protein	<i>Homo sapiens</i>
5	E2F1	1869	E2F transcription factor 1; retinoblastoma-associated protein 1	<i>Homo sapiens</i>
6	β Cat	1499	CTNNB1 catenin cadherin-associated protein, beta 1, 88kDa	<i>Homo sapiens</i>
7	TAg	1489531	tumor antigen gene	<i>Simian Virus 40</i>
8	Myb	4602	transcriptional activator Myb; v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog	<i>Homo sapiens</i>
9	Id3	3399	DNA-binding protein inhibitor ID-3; dominant negative helix-loop-helix protein 3	<i>Homo sapiens</i>
10	E7	1489079	transforming protein E7	<i>Humaner Papillomavirus Typ 16</i>
11	E6	1489078	transforming protein E6	<i>Humaner Papillomavirus Typ 16</i>
12	Bcl2	12043	apoptosis regulator Bcl-2; B-cell CLL/lymphoma 2	<i>Mus musculus</i>
13	HoxA9	3205	homeobox protein Hox-A9	<i>Homo sapiens</i>
14	Bmi1	12151	BMI1 polycomb ring finger protein	<i>Mus musculus</i>
15	PymT	1489533	MPyVgp2 middle t-antigen	<i>Polyoma Virus</i>
16	Core		HCV-Core Protein	<i>Hepatitis C Virus</i>
17	Oct3	5460	octamer-binding transcription factor-3; POU domain class 5 transcription factor 1	<i>Homo sapiens</i>
18	Klf4	9314	Krueppel-like factor 4; endothelial Kruppel-like zinc finger protein	<i>Homo sapiens</i>
19	Id1	3397	inhibitor of DNA binding 1; dominant negative helix-loop-helix protein 1	<i>Homo sapiens</i>
20	c-Myc	4609	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	<i>Homo sapiens</i>
21	Lmo2	4005	LIM domain only 2; T-cell translocation protein 2	<i>Mus musculus</i>
22	Nfe2L2	4780	nuclear factor erythroid-derived 2-like 2	<i>Homo sapiens</i>
23	Yap1	22601	Yes-associated protein 1	<i>Mus musculus</i>
24	Nanog	71950	homeobox transcription factor Nanog	<i>Mus musculus</i>
25	Sox2	6657	SRY (sex determining region Y)-box 2 transcription factor	<i>Homo sapiens</i>
26	RhoA	387	ras homolog family member A	<i>Homo sapiens</i>
27	Ezh2	2146	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	<i>Homo sapiens</i>
28	Gli1	2735	glioma-associated oncogene homolog 1 zinc finger protein	<i>Homo sapiens</i>
29	v-Myc	4613	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived	<i>Homo sapiens</i>
30	Sez12	23512	DGCR2 DiGeorge syndrome critical region gene 2	<i>Homo sapiens</i>
31	ZFP217	7764	zinc finger protein 217	<i>Mus musculus</i>
32	Id4	3400	inhibitor of DNA binding 4; dominant negative helix-loop-helix protein	<i>Homo sapiens</i>
33	Rex	22702	REX1 transcription factor; reduced expression protein	<i>Homo sapiens</i>

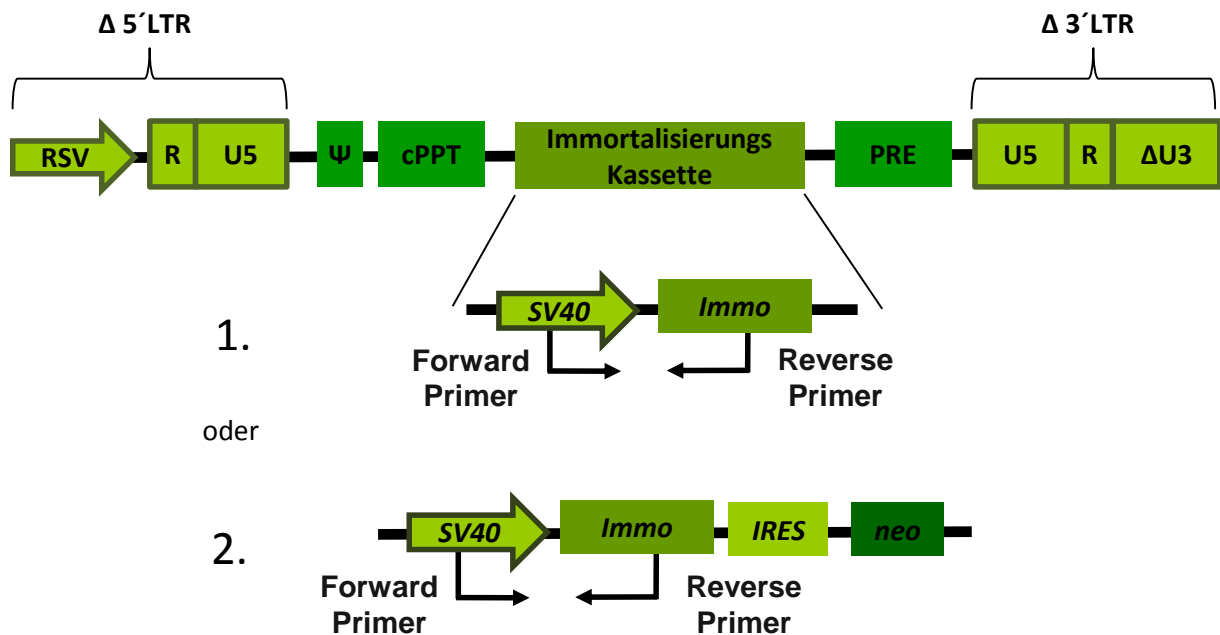


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Aufbaus der zur Immortalisierung verwendeten Lentiviren

Die Abbildung zeigt sowohl den schematischen Aufbau der lentiviralen Vektoren als auch den schematischen Aufbau der Genexpressionskassetten, welche die Expression der Immortalisierungsgene vermittelt. Die 5'LTR Promotor-Region des Selbst-Inaktivierenden-(SIN)-Lentivirus enthält den Rous-Sarkom Virus Promotor (RSV). Die R und U5 Region des 5'LTR sind wichtig für die Transkription des Virus. Darauf folgt das Psi-Element (Ψ) und das zentrale Poly-Purin Trakt-Element (cPPT). Die Expression der Immortalisierungsgene wird durch den Simian Virus 40 Promotor (SV40) gewährleistet, wobei entweder Genexpressionskassetten etabliert wurden, die nur für das Immortalisierung kodieren (1.), oder darüber hinaus, mittels eines IRES-Element (interne ribosomale Eintrittsstelle) auch die Expression des Neomycin-Resistenz-vermittelnden Gens (2.) ermöglichen. Das Post-transkriptionale Regulator-Element (PRE) stabilisiert die m-RNA und das Δ 3'LTR zerstört die 5'-Promotor-Aktivität nach Integration.

Der Aufbau der Viren mit den enthaltenen strukturellen Elementen, sowie der integrierten Genexpressionskassette sind in Abbildung 9 dargestellt. Das 5'LTR bildet die Promotor und Enhancer-Region des Virus. In den Lentiviren der dritten Generation ist der 5'U3-Promotor durch einen heterologen Promotor ersetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Konstrukte benutzten den Rous-Sarkom Virus Promotor (RSV). Die R und U5 Regionen sind wichtig für die Transkription des Virus. Das Psi-Element (Ψ) ist für das Verpacken der viralen RNA essentiell. Das darauf folgende zentrale Poly-Purin Trakt-Element (cPPT) ist das nukleare Translokationselement und vermittelt den Eintritt des Prä-Integrationskomplexes in den Zellkern. Die Expressionskassette enthält den Simian Virus 40 Promotor (SV40) (Gilinger and Alwine 1993) der entweder nur das entsprechende Immortalisierungsgen exprimiert (1.) oder zusätzlich ein IRES-Element (interne ribosomale Eintrittsstelle) beinhaltet, wodurch die Expression des Neomycin-Resistenz-vermittelnden Gens ermöglicht wird (2.). Das Post-transkriptionale Regulator-Element (PRE) wirkt sich positiv auf die Stabilität der m-RNA aus und erhöht somit das Expressionslevel auf eine Transgen-, Promotor und Vektor unabhängige Art und Weise. Die in allen Selbst-Inaktivierenden-(SIN)-Lentiviren enthaltenen Sequenz-Deletionen in der U3-Region des 3'LTR zerstören die 5'-Promotor-Aktivität nach Integration.

3.3 Generierung funktionaler physiologisch relevanter Endothelzelllinien

In dieser Arbeit wurden Zelllinien unterschiedlichen endothelialen Ursprungs generiert, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

3.3.1 Humane Nabelschnur Endothel-Zelllinien

Es wurde die Hypothese verfolgt, dass für die Immortalisierung eines bestimmten Zelltyps eine spezifische Kombination von Immortalisierungsgenen benötigt wird. Daraus folgt, dass unterschiedlichste Genkombinationen für die Immortalisierung verschiedener Zelltypen identifiziert werden müssen. Um dies mit einem vertretbaren Aufwand - sowohl materiell als auch zeitlich - zu erzielen, wurden die primären Zellen mit der kompletten Bank oder unterschiedlichen Genkombinationen gleichzeitig transduziert. Mit dieser Herangehensweise wird mit geringem Aufwand, eine größtmögliche Anzahl an unterschiedlichen Genkombinationen in primäre Zellen transduziert. Nach Transduktion werden die Zellen expandiert, um zu sehen ob eine Immortalisierung erzielt werden konnte. Somit werden die Gene heraus gesiebt, die auch tatsächlich zu einer Immortalisierung führen.

Um die Genkombination zu identifizieren, die einerseits zu einer robusten Immortalisierung führt und andererseits den primären Phänotyp der Ursprungszellen erhält, wurden für die humanen Nabelschnur Endothel-Zelllinien (im Folgenden als HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells) drei aufeinander folgende Infektionsrunden durchgeführt. Zunächst sollte in der ersten Infektion die Genkombinationen ermittelt werden, welche eine Immortalisierung der primären HUVECs ermöglichen.

Nach Transduktion wurden die Zellen expandiert um festzustellen, ob eine Immortalisierung durch die verwendeten Gene erreicht werden konnte. Wenn eine Immortalisierung der primären Zellen erzielt werden konnte, wurde durch PCR festgestellt, welche Gene in das Genom integriert sind. Hierzu wurde aus jeder erzielten Zelllinie genomische DNA (siehe 2.2.4) isoliert. Anschließend wurde für jedes einzelne zur Infektion verwendete Immortalisierungsgen eine PCR mit Hilfe zweier Primer durchgeführt. Dabei bindet der Forward Primer spezifisch in dem SV-40 Promotor der Expressionskassette und der Reverse Primer spezifisch in dem entsprechenden Immortalisierungsgen (siehe Abbildung 9). Mit Hilfe dieser Methode wird jedes Immortalisierungsgen, welches im Genom einer Zelllinie integriert ist, detektiert und somit können die Gene ermittelt werden, welche vermutlich an der Immortalisierung der primären Zellen beteiligt sind.

Ausgehend von den so identifizierten Genen, sollten in den folgenden Infektionen die Anzahl der Gene reduziert werden, da anzunehmen war, dass weniger in das Genom eingebrachte Gene dem primären Phänotyp zuträglich sind und so ein optimales Ergebnis in Bezug auf beide Kriterien (Proliferation und Funktion) erzielt werden kann.

3.3.1.1 Immortalisierung von HUVECs

In der ersten Infektionsrunde (I49; siehe Tabelle 3) wurden fünf Infektionen durchgeführt, um Genkombinationen zu identifizieren, die in der Lage sind HUVEC Zellen zu immortalisieren. In den ersten beiden Spalten der Tabelle sind die, in den entsprechenden lentiviralen Expressionskassetten, enthaltenen Immortalisierungsgene aufgeführt. In den Spalten 3-7 sind die Infektionen der ersten Infektionsrunde I49 aufgeführt. Die Gene, die nicht zur Infektion verwendet wurden sind durch ein weißes Kästchen gekennzeichnet. Die Gene, die nach Infektion nicht mittels PCR nachgewiesen werden konnten sind rot markiert und die Gene die durch PCR detektiert werden konnten sind in grün markiert. In der vorletzten Zeile sind die kumulativen Populationsverdopplungen der entsprechenden Infektionen angegeben und in der letzten Zeile die Tage, die die Zellen in Kultur gehalten wurden. In der ersten Infektion wurden die primären HUVEC-Zellen mit der kompletten lentiviralen Immortalisierungsbank infiziert (Infektion I49-1). In Infektion I49-2 wurden diejenigen Gene ausgelassen, die in klassischen Immortalisierungsmethoden Verwendung finden (TAg, E6, E7, c-Myc). In den restlichen Infektion (I49-3 bis I49-5) wurden zufällige Kombinationen der Immortalisierungsgene verwendet (siehe Tabelle 3).

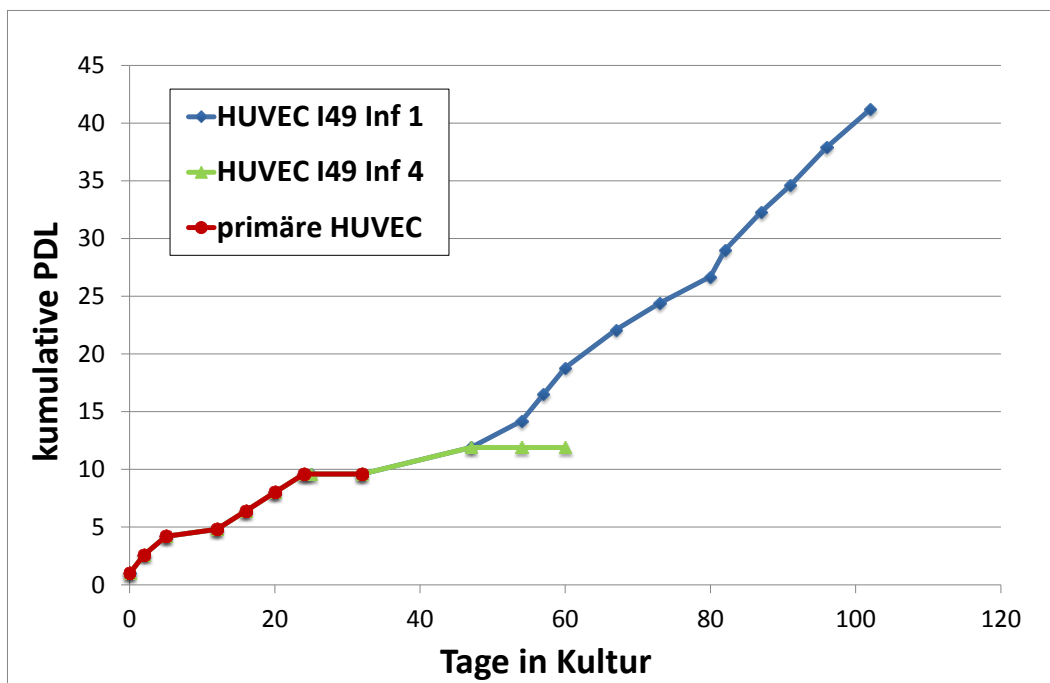


Abbildung 10: Kumulative Populationsverdopplung der ersten HUVEC Infektionsrunde (I49)

Dargestellt sind beispielhaft die kumulativen Populationsverdopplungen über die Tage in Kultur der Infektion 1 und Infektion 4 der ersten HUVEC Infektionsrunde I49. Zum Vergleich der Lebensdauer und Proliferationsstärke ist die kumulative Populationsverdopplung von primären HUVEC-Zellen in Rot dargestellt. Die Expansion der Zelllinien wurde nach 102 Tagen eingestellt, Infektion 4 gereichte nicht zu einer Immortalisierung der primären HUVEC Zellen und starb nach 60 Tagen. Die primären HUVECs hörten bereits nach 24 Tagen in Kultur und einer cPDL von 9,6 auf zu proliferieren und starben nach 32 Tagen in Kultur.

Nach Expansion der Zellen in Kultur konnten aus allen Infektionen Zelllinien generiert werden, lediglich Infektion I49-4 führte nicht zu einer Immortalisierung der primären HUVECs. Sie hörte bereits nach 47 Tagen in Kultur und einer kumulativen Populationsverdopplung (im Folgenden cPDL) auf zu proliferieren und starb letztendlich nach 60 Tagen (siehe Tabelle 3 und Abbildung 10). Die primären HUVECs hörten bereits nach 24 Tagen in Kultur und einer cPDL von 9,6 auf zu proliferieren und starben nach 32 Tagen in Kultur (siehe Abbildung 10). Die Expansion der Zelllinien 1, 2, 3 und 5 wurde nach 102 Tagen eingestellt (siehe Tabelle 3; Abbildung 10 und 3.4). Abschließend lässt sich sagen, dass die Gene ID2, c-Fos, ID3, ID1, c-Myc und Nanog gehäuft in den vier Zelllinien über die PCR-Analyse detektiert werden konnten (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Erste HUVEC Infektionsrunde I49

Nr.	Gene	I49 Inf 1	I49 Inf 2	I49 Inf 3	I49 Inf 4	I49 Inf 5
1	Id2					
2	Fos					
3	NS1					
4	Jun					
5	E2F1					
6	βCat					
7	TA _g					
8	Myb					
9	Id3					
10	E7					
11	E6					
12	Bcl2					
13	HoxA9					
14	Bmi1					
15	PymT					
16	Core					
17	Oct3					
18	Klf4					
19	Id1					
20	Myc					
21	Lmo2					
22	Nfe2L2					
23	Yap1					
24	Nanog					
25	Sox2					
26	RhoA					
27	Ezh2					
28	Gli1					
29	v-Myc					
30	Sez12					
31	ZFP217					
32	Id4					
33	Rex					
	Zelllinie	ja	ja	ja	nein	ja
	cum. PDL	41,2	38,2	37,2	11,9	37,5
	Tage in Kultur	102	102	102	47	102

3.3.1.2 Reduzierung der zur Immortalisierung von HUVECs benötigten Gene

In der zweiten Infektionsrunde I20 wurden ebenfalls fünf Infektionen durchgeführt (siehe Tabelle 4 und Abbildung 11). In der ersten Infektion wurden die primären HUVECs ausschließlich mit dem Onkogen humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) infiziert, um zu testen, ob primäre HUVECs nach einer klassischen Methode immortalisiert werden können. hTERT ist die enzymatisch aktive, der Regulation unterliegende Untereinheit der humanen Telomerase. hTERT wird standardmäßig zur Immortalisierung in klassischen Verfahren angewendet (Bodnar et al. 1998). Die Überexpression von hTERT ist oft ausreichend um eine Immortalisierung herbeizuführen. Wie jedoch in Tabelle 4 und Abbildung 11 ersichtlich, stirbt Infektion I20-1 bereits nach 55 Tagen in Kultur und 35 kumulativen Populationsverdopplungen.

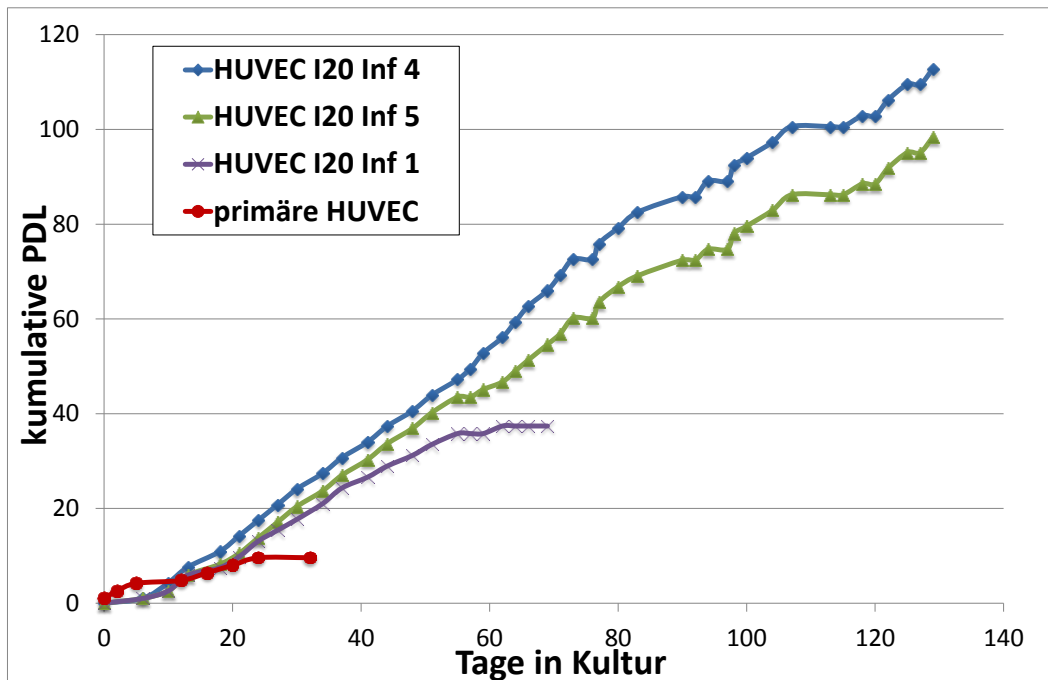


Abbildung 11: Kumulative Populationsverdopplung der zweiten HUVEC Infektionsrunde (I20)

Dargestellt sind beispielhaft die kumulativen Populationsverdopplungen über die Tage in Kultur der Infektionen 1, 4 und Infektion 5 der zweiten HUVEC Infektionsrunde I20. Zum Vergleich der Lebensdauer und Proliferationsstärke ist die kumulative Populationsverdopplung von primären HUVEC-Zellen in Rot dargestellt. Die Expansion der Zelllinien wurde nach 129 Tagen eingestellt. Infektion 1 konnte nicht immortalisiert werden und starb nach 55 Tagen in Kultur. Die primären HUVECs hörten bereits nach 24 Tagen in Kultur und einer cPDL von 9,6 auf zu proliferieren und starben nach 32 Tagen in Kultur.

Für die weiteren Infektionen (I20-2 bis I20-5) wurden unterschiedliche Kombinationen der Gene verwendet, die in der ersten Infektionsrunde I49 in den Linien I49-1 und I49-2 mittels PCR detektiert werden konnten (siehe Tabelle 3). Zusätzlich fanden noch andere Gene bei der Infektion I20 Verwendung, die entweder in klassischen Methoden verwendet werden (TAG, E6) oder aber im Zusammenhang weiterer erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Immortalisierungen anderer Zelltypen häufig vertreten waren (Core).

Tabelle 4: Zweite HUVEC Infektionsrunde I20

Nr.	Gene	hTert	I20 Inf 2	I20 Inf 3	I20 Inf 4	I20 Inf 5
1	Id2					
2	Fos					
3	NS1					
4	Jun					
5	E2F1					
6	βCat					
7	TA _g					
8	Myb					
9	Id3					
10	E7					
11	E6					
12	Bcl2					
13	HoxA9					
14	Bmi1					
15	PymT					
16	Core					
17	Oct3					
18	Klf4					
19	Id1					
20	Myc					
21	Lmo2					
22	Nfe2L2					
23	Yap1					
24	Nanog					
25	Sox2					
26	RhoA					
27	Ezh2					
28	Gli1					
29	v-Myc					
30	Sez12					
31	ZFP217					
32	Id4					
33	Rex					
Zelllinie		nein	ja	ja	ja	ja
cum. PDL		35,8	78,4	74	112,8	98,4
Tage in Kultur		55	91	94	129	129

In Tabelle 4 ist das Ergebnis der PCR-Analysen der zweiten HUVEC Infektionsrunde dargestellt. In den Spalten 1-2 sind die Immortalisierungsgene aufgeführt. In den Spalten 3-7 sind die Infektionen aufgeführt. Die Gene, die nicht zur Infektion verwendet wurden sind durch ein weißes Kästchen gekennzeichnet. Die Gene, die nach Infektion nicht mittels PCR nachgewiesen werden konnten sind rot markiert und die Gene die durch PCR detektiert werden konnten sind in grün markiert. In der vorletzten Zeile sind die kumulativen Populationsverdopplungen angegeben und in der letzten Zeile die Tage, die die Zellen in Kultur gehalten wurden. Aus vier der fünf I20 Infektionen konnten Zelllinien generiert werden (siehe Tabelle 4 und Abbildung 11). Am besten proliferierten jedoch die Linien I20-4

und I20-5. Dabei enthält I20-4 das gleiche Set an Genen wie I20-5, jedoch zusätzlich noch die Gene TAg, E7 und E6 (siehe Tabelle 4). I20-4 weist einen kleinen Proliferationsvorteil (siehe Abbildung 11) auf, was vermutlich auf die integrierten starken Immortalisierungsgene TAg, E7 und E6 zurückzuführen ist (siehe Tabelle 4).

Die beiden Linien I20 4 und 5 wiesen das beste und ein sehr ähnliches Proliferationspotential auf. Da in Infektion 4 jedoch die starken Onkogene TAg, E7 und E6 integrierten (siehe Tabelle 4), und das Ziel war, eine physiologische Immortalisierung von primären HUVECs zu erreichen, habe ich mich dazu entschieden, diese Gene zu vermeiden und mit der in Infektion 5 detektierten Kombination der Gene ID-2, Fos, ID-1 und c-Myc, die über PCR nachgewiesen werden konnten, weiter zu arbeiten (siehe Tabelle 4). In der Charakterisierung dieser beiden Zelllinien bestätigte sich die Vermutung, da Infektion 4 einen entarteten Phänotyp aufwies. Die starke Proliferation und der schlechte Phänotyp in der Charakterisierung der Linie I20-4 im Vergleich zu I20-5, sind vermutlich der Integration der starken Immortalisierungsgene geschuldet. Dies bestärkt die Hypothese, dass die Transduktion solch starker Gene zwar zu einer robusten Proliferation, jedoch zu keinem funktionalen Phänotyp führt. Durch die in Linie I20-5 gefundene Genkombination ist eine funktionale Immortalisierung gelungen, in der die Zellen eine robuste Proliferation aufweisen und einen teilweise physiologisch relevanten Phänotyp behalten. Somit war die Reduzierung, der in der vorhergehenden Runde I49 gefundenen Genkombination zur Immortalisierung, bereits in der zweiten Runde I20 auf die nur vier Kandidaten der Linie I20-5 erfolgreich.

3.3.1.3 Die essentielle Genkombination zur funktionalen HUVEC Immortalisierung

Da sich die Zelllinie I20-5 der zweiten Infektionsrunde während der Charakterisierung für endothel-spezifische Marker und Funktionen im Vergleich mit primären HUVEC-Zellen sehr ähnlich verhielt, wurden die vier in dieser Linie detektierten Gene zur Infektion in der dritten Runde I38 verwendet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zur Infektion verwendete Gene der Infektionen I38

I38-1	I38-2	I38-3	I38-4	I38-5
c-Myc	c-Myc		c-Myc	c-Myc
ID-1	ID-1	ID-1	ID-1	
ID-2	ID-2	ID-2		ID-2
Fos		Fos	Fos	Fos

In Infektion I38-1 wurden primäre HUVECs mit allen vier Genen (ID-2, Fos, ID-1 und c-Myc) infiziert (siehe Tabelle 5). Um zu evaluieren, ob eine Reduktion der Gene möglich ist und durch unterschiedliche Genkombinationen eine Verbesserung des Phänotyps erzielt werden

kann, wurde bei den Infektionen I38-2 bis 5 jeweils eines der vier Gene bei der Infektion ausgelassen (siehe Tabelle 5).

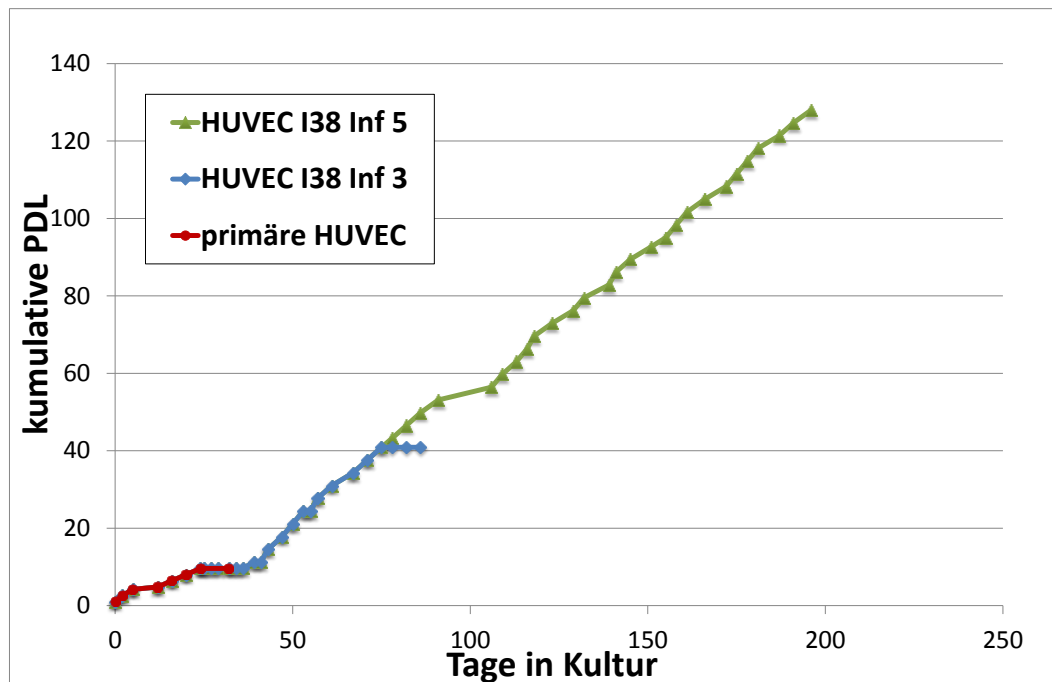


Abbildung 12: Kumulative Populationsverdopplungen der dritten Infektionsrunde (I38)

Dargestellt sind beispielhaft die kumulativen Populationsverdopplungen über die Tage in Kultur der Infektion 3 und Infektion 5 der dritten HUVEC Infektionsrunde I38. Zum Vergleich der Lebensdauer und Proliferationsstärke ist die kumulative Populationsverdopplung von primären HUVEC-Zellen in Rot dargestellt. Die Expansion der Zelllinien wurde nach 196 Tagen eingestellt. Infektion 3 konnte nicht immortalisiert werden und starb nach 74 Tagen in Kultur. Die primären HUVECs hörten bereits nach 24 Tagen in Kultur und einer cPDL von 9,6 auf zu proliferieren und starben nach 32 Tagen in Kultur.

Da Linie I38-1 lediglich eine Verifizierung von I20-5 war und die Zelllinien auf das essentielle Set der Gene reduziert werden sollten, wurde die Expansion von I38-1 nach Charakterisierung und 91 Tagen eingestellt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Dritte HUVEC Infektionsrunde I38

	I38-1	I38-2	I38-3	I38-4	I38-5
	c-Myc	c-Myc		c-Myc	c-Myc
	ID-1	ID-1	ID-1	ID-1	
	ID-2	ID-2	ID-2		ID-2
	Fos		Fos	Fos	Fos
Zelllinie	ja	ja	nein	ja	ja
cPDL	53,1	122	40,9	122,7	128
Tage in Kultur	91	196	74	196	196

Mit Hilfe der in Infektion I38-3 verwendeten Gene konnte keine Immortalisierung erzielt werden und die Zellen starben nach 74 Tagen (siehe Tabelle 6 und Abbildung 12). Daraus lässt sich folgern, dass c-Myc ein essentieller Faktor in der Genkombination ist, um eine Immortalisierung der primären HUVECs zu erreichen. Die Reduzierung auf drei Gene inklusive c-Myc in den Infektionen I38-2, I38-4 und I38-5 führte in jedem Fall zu einer Zelllinie, die eine robuste Proliferation und einem primär-ähnlichen Phänotyp aufweist (siehe 3.4). Durch die Verwendung von c-Myc und zwei der drei anderen Gene in unterschiedlichen Kombinationen (siehe Tabelle 6) ergaben sich ebenfalls Unterschiede in der Charakterisierung für Endothel-spezifische Marker und Funktionen. Somit variieren die Ergebnisse der Zelllinien I38-2, I38-4 und I38-5 durch das unterschiedliche Set an integrierten Immortalisierungsgenen in der Charakterisierung voneinander. Dabei verhält sich die Linie I38-2 in der Summe der Marker und Funktionen am primär-ähnlichsten (siehe 3.4). Die Expansion der Zelllinien wurde nach abgeschlossener Charakterisierung und 196 Tagen in Kultur eingestellt (siehe Tabelle 6 und Abbildung 12).

3.3.2 Humane mikrovaskuläre Endothel-Zelllinien

Um Zelllinien aus primären humanen mikrovaskulären Endothelzellen (im Folgenden HMVEC) zu generieren, wurde eine ähnliche Herangehensweise gewählt, wie sie bei der Immortalisierung von HUVECs erfolgreich war.

3.3.2.1 Immortalisierung von HMVECs

In der ersten Infektionsrunde I46 wurden zwölf Infektionen durchgeführt, um zu ermitteln, ob eine Immortalisierung von primären HMVECs überhaupt möglich ist und wenn ja, mit welchen Genkombinationen dies erzielt werden kann.

In Tabelle 7 ist das Ergebnis der PCR-Analyse der ersten HMVEC Infektionsrunde dargestellt. In den Spalten 1-2 sind die Immortalisierungsgene aufgeführt und in den Spalten 3-11 sind die Infektionen aufgeführt. Die Gene, die nicht zur Infektion verwendet wurden, sind durch ein weißes Kästchen gekennzeichnet. Die Gene, die nach Infektion nicht mittels PCR nachgewiesen werden konnten, sind durch ein rotes Kästchen markiert, und die Gene, die durch PCR detektiert werden konnten, sind grün markiert. In der vorletzten Zeile sind die kumulativen Populationsverdopplungen angegeben, die die entsprechenden Zellen erreicht haben, und in der letzten Zeile die Tage, die die Zellen in Kultur gehalten wurden.

In Infektion I46-3 wurden die primären Zellen mit der kompletten Genbank, außer den starken Immortalisierungsgenen (TAg, E7, E6, c-Myc; siehe Tabelle 7), infiziert. In den Infektionen I46-4 bis I46-6 wurden zufällige Kombinationen der Gene verwendet. In den Infektionen 8-11 wurden verschiedene zufällige Kombinationen von jeweils 10 Genen für drei sequentielle Infektionen eingesetzt, wobei die entsprechenden Infektionen jeweils über

Nacht durchgeführt wurden. Die einzelnen Infektionssequenzen sind in der Tabelle 7 durch blaue Linien voneinander abgegrenzt. Für die Infektionen 9-11 wurde ähnlich verfahren, wobei jedoch nur zwei aufeinanderfolgende Infektionszyklen durchgeführt wurden und jede dieser Infektionen nur mit zwei anstatt drei Gen-Sets transduziert wurde. Jedoch konnte durch die Infektion in Etappen kein Effekt in Bezug auf einen Integrationsvorteil oder die Immortalisierungseffizienz beobachtet werden. Für Infektion 12 wurde die komplette Genbank zur Transduktion verwendet (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Erste HMVEC Infektionsrunde I46

Nr.	Gene	I46 Inf 3	I46 Inf 4	I46 Inf 5	I46 Inf 6	I46 Inf 8	I46 Inf 9	I46 Inf 10	I46 Inf 11	I46 Inf 12
1	Id2									
2	Fos									
3	NS1									
4	Jun									
5	E2F1									
6	βCat									
7	TAg									
8	Myb									
9	Id3									
10	E7									
11	E6									
12	Bcl2									
13	HoxA9									
14	Bmi1									
15	PymT									
16	Core									
17	Oct3									
18	Klf4									
19	Id1									
20	Myc									
21	Lmo2									
22	Nfe2L2									
23	Yap1									
24	Nanog									
25	Sox2									
26	RhoA									
27	Ezh2									
28	Gli1									
29	v-Myc									
30	Sez12									
31	ZFP217									
32	Id4									
33	Rex									
	Zelllinie	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja
	cum. PDL	28,3	41,4	18,4	18,4	44,4	28,3	18,4	15,1	154,3
	Tage in Kultur	73	129	46	55	129	73	51	42	233

In der ersten Infektionsrunde I46 konnten die drei HMVEC-Zelllinien I46-4, I46-8 und I46-12 generiert werden. Die über PCR in ihnen detektierten Gene sind zur besseren Übersicht nochmal in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8: Die über PCR-Analyse detektierten Gene der drei HMVEC-Zelllinien

I46-12	ID2	ID3	Fos	ID1	HoxA9	Nanog	Ezh2	Sox2	Gli1	TAg	E7	Myc
I46-8	ID2	ID3	Fos	ID1	HoxA9	Nanog	Ezh2					
I46-4	ID2	ID3	Fos	BCI2								

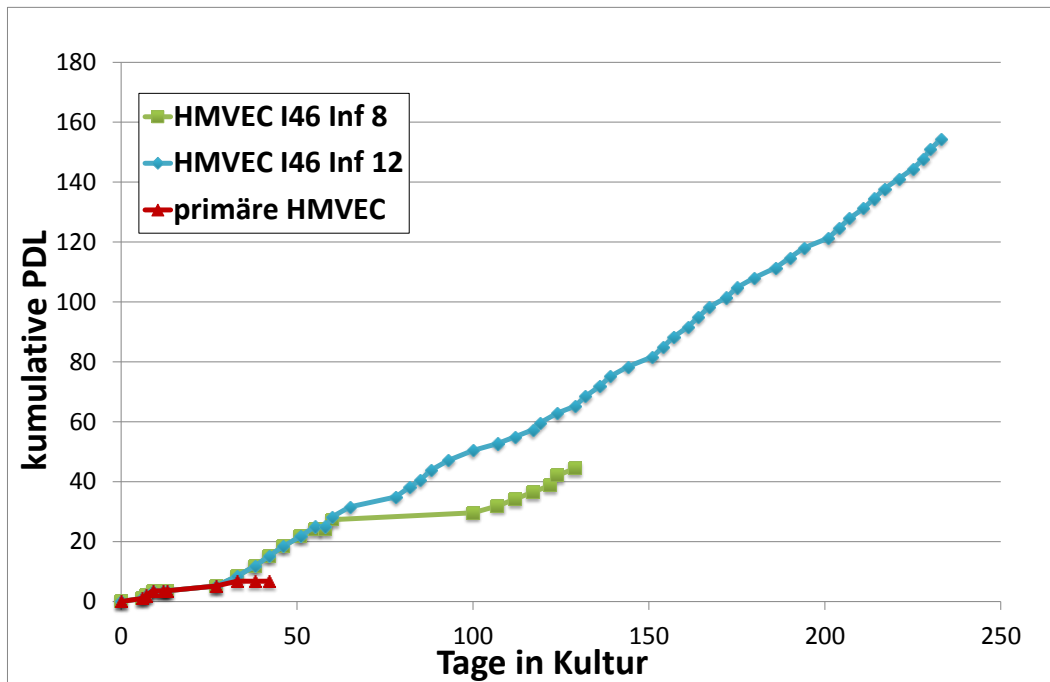


Abbildung 13: Kumulative Populationsverdüppungen der Zelllinien von I46

Dargestellt sind beispielhaft die kumulativen Populationsverdüppungen über die Tage in Kultur der HMVEC Infektion 8 und Infektion 12 der ersten Infektionsrunde I46. Zum Vergleich der Lebensdauer und Proliferationsstärke ist die kumulative Populationsverdüppung von primären HMVEC-Zellen in Rot dargestellt. Die Expansion der Zelllinie I46-8 wurde nach 129 Tagen eingestellt. Die Infektion I46-12 wurde für 233 Tage in Kultur gehalten und dann ihre Expansion eingestellt. Die primären HMVECs hörten bereits nach 33 Tagen in Kultur und einer cPDL von 6,8 auf zu proliferieren und starben nach 42 Tagen in Kultur.

Die Linie I46-12 weist eine viel größere Proliferationsstärke im Vergleich zu I46-8 auf (siehe Abbildung 13). Das mag an den in ihr integrierten starken Onkogenen TAg und E7 liegen, für die bekannt ist, dass sie eine robuste Proliferation in den durch sie immortalisierten primären Zellen induzieren (Zwerschke and Jansen-Durr 2000). Deswegen wurde die Expansion der Linien I46-4 und 8 nach 129 Tagen in Kultur und beendeter Charakterisierung eingestellt und mit Infektion I46-12 weiter gearbeitet (siehe Tabelle 7). I46-12 wurde weiter kultiviert um sie im Vergleich zu primären HMVECs, sowie den generierten Zelllinien der nächsten HMVEC Infektionsrunde I8 gemeinsam einer Charakterisierung für endothel-

spezifische Marker und Funktionen zu unterziehen. Nachdem dieses abgeschlossen war, wurde die Expansion von I46-12 nach 233 Tagen beendet (siehe Tabelle 7 und Abbildung 13).

3.3.2.2 Reduzierung der zur Immortalisierung von HMVECs benötigten Gene

In der zweiten Infektionsrunde I8 wurden zehn Infektionen durchgeführt (siehe Tabelle 9). Es sollte dabei untersucht werden, ob die in I46 detektierten Genkombinationen weiter reduziert werden können oder andere Genkombinationen wirksam sind, die bei anderen Zelltypen zu einer erfolgreichen Immortalisierung geführt haben.

Tabelle 9: Zweite HMVEC Infektionsrunde I8

Nr.	Gene	I8 Inf 1	I8 Inf 2	I8 Inf 3	I8 Inf 4	I8 Inf 5	I8 Inf 6	I8 Inf 7	I8 Inf 8	I8 Inf 9	I8 Inf 10
1	Id2										
2	Fos										
3	NS1										
4	Jun										
5	E2F1										
6	βCat										
7	TA9										
8	Myb										
9	Id3										
10	E7										
11	E6										
12	Bcl2										
13	HoxA9										
14	Bmi1										
15	PymT										
16	Core										
17	Oct3										
18	Klf4										
19	Id1										
20	Myc										
21	Lmo2										
22	Nfe2L2										
23	Yap1										
24	Nanog										
25	Sox2										
26	RhoA										
27	Ezh2										
28	Gli1										
29	v-Myc										
30	Sez12										
31	ZFP217										
32	Id4										
33	Rex										
Zelllinie	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein
cum. PDL	26,9	42,7	54,6	22,3	20	53,2	22,3	22,3	17,7	17,7	
Tage in Kultur	97	132	133	68	84	134	91	91	68	68	

In Tabelle 9 ist das Ergebnis der PCR-Analyse der zweiten Infektionsrunde dargestellt. In den Spalten 1-2 sind die Immortalisierungsgene aufgeführt. In den Spalten 3-12 sind die Infektionen aufgeführt. Die Gene, die nicht zur Infektion verwendet wurden sind durch ein weißes Kästchen gekennzeichnet. Die Gene, die nach Infektion nicht mittels PCR nachgewiesen werden konnten sind rot markiert und die Gene die durch PCR detektiert werden konnten sind in grün markiert. In der vorletzten Zeile sind die kumulativen Populationsverdopplungen angegeben und in der letzten Zeile die Tage, die die Zellen in Kultur gehalten wurden.

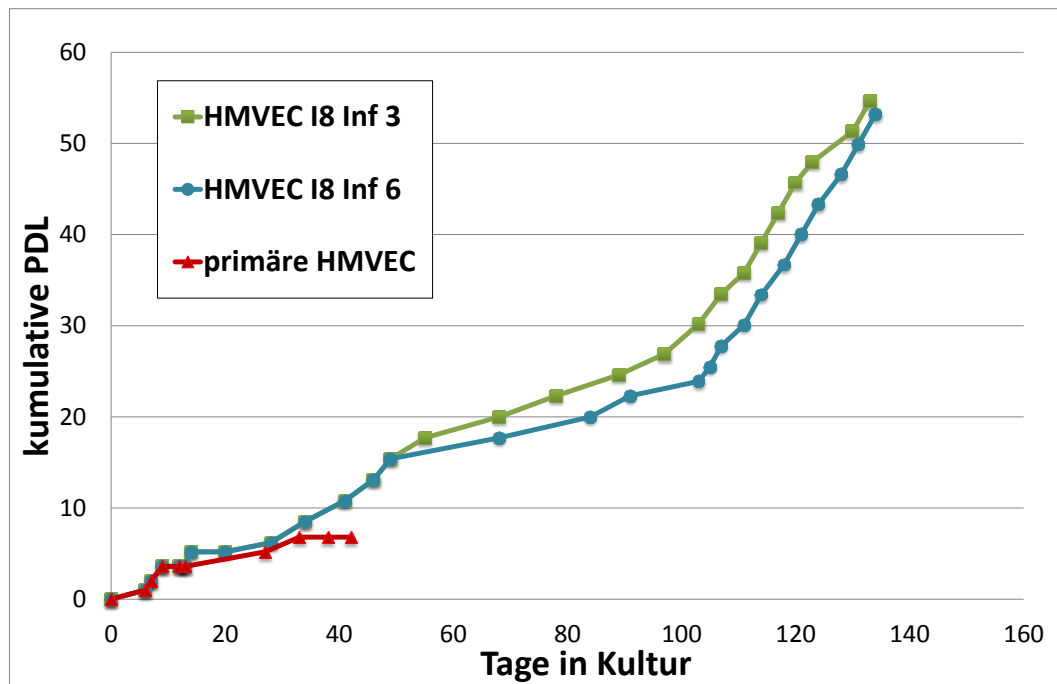


Abbildung 14: Kumulative Populationsverdopplungen der Zelllinien von I8

Dargestellt sind beispielhaft die kumulativen Populationsverdopplungen über die Tage in Kultur der HMVEC Infektion 3 und Infektion 6 der zweiten Infektionsrunde I8. Zum Vergleich der Lebensdauer und Proliferationsstärke ist die kumulative Populationsverdopplung von primären HMVEC-Zellen in Rot dargestellt. Die Expansion der Zelllinien wurde nach 134 Tagen eingestellt. Die primären HMVECs hörten bereits nach 33 Tagen in Kultur und einer cPDL von 6,8 auf zu proliferieren und starben nach 42 Tagen in Kultur.

Für Infektion I8-1 wurden die Gene ID-2, Fos und ID-3 verwendet, da diese Faktoren bei fast allen von unserer Arbeitsgruppe etablierten Zelllinien eine prominente Rolle spielen. In den Infektionen I8-2 und I8-3 wurde die in Linie I46-8 detektierte Genkombination verwendet, wobei bei I8-2 Nanog und HoxA9 ausgelassen wurden und bei I8-3 nur HoxA9. I8-4 entspricht I46-4 ohne Bcl2. I8-5 wurde mit E7 und Ezh2 infiziert, da diese Kombination bei Cornea-Zellen suffizient zur Immortalisierung war. Die Infektionen I8-6 und I8-7 wurden mit der in Infektion I46-12 detektierten Genkombination infiziert, wobei bei I8-6 die Gene Nanog und ID-1 ausgelassen wurden und bei Infektion I8-7 nur das Gen ID-1. In Infektion I8-8 wurde die Kombination aus RhoA und Ezh2 verwendet, die in Fibroblasten zu einer Immortalisierung führte. Die Kombination von E7, Ezh2 und Rex wurde für Infektion I8-9 genauso verwendet wie für I8-10, wobei bei I8-10 noch Nanog eingesetzt wurde (siehe Tabelle 9).

Letztendlich konnten in der zweiten Infektionsrunde der adulten Zellen drei Zelllinien generiert werden (siehe Tabelle 9 und Abbildung 14). In den Linien I8-2, I8-3 und I8-6 konnte durch die Reduzierung des Gen-Sets zwar eine Immortalisierung erreicht werden, jedoch schnitten diese Zelllinien während der Charakterisierung im Vergleich zu primären HMVECs und der Linie I46-12 deutlich schlechter ab als die Linie I46-12. Die Expansion der I8 Linien wurde nach spätestens 134 Tagen eingestellt (siehe Tabelle 9 und Abbildung 14).

3.3.3 Porzine Blut-Hirn-Schranken Endothel-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob es möglich ist eine Zelllinie aus primären porzinen Blut-Hirn-Schranken Endothelzellen (im Folgenden PBEC) zu generieren, wurden 13 Infektionen durchgeführt, wobei die jeweilige Genkombination 1x oder 2x zu Infektion eingesetzt wurde (siehe Tabelle 10). Dabei wurden zur Kontrolle der Infektionseffizienz in den ersten beiden PBEC Infektionen die Zellen einmal oder zweimal aufeinanderfolgend mit GFP transduziert, da so identifiziert werden kann, wie viel Prozent der Zellen mit den gewählten Infektionsbedingungen modifiziert werden können.

In Tabelle 10 ist das Infektionsschema und Ergebnis der PCR-Analyse dargestellt. In den ersten beiden Spalten sind die Immortalisierungsgene aufgeführt. In den Spalten 3-13 sind die Infektionen aufgeführt, die zur Immortalisierung der primären PBEC-Zellen realisiert wurden. Die Gene, die nicht zur Infektion verwendet wurden sind durch ein weißes Kästchen gekennzeichnet. Die Gene, die nach Infektion nicht mittels PCR nachgewiesen werden konnten sind rot markiert und die Gene die durch PCR detektiert werden konnten sind in grün markiert. In der vorletzten Zeile sind die kumulativen Populationsverdopplungen der entsprechenden Infektionen angegeben und in der letzten Zeile die Tage, die die Zellen in Kultur gehalten wurden.

In der dritten und vierten PBEC Infektion wurden die Gene Fos, ID-1 und c-Myc eingesetzt, deren Kombination bereits bei der HUVEC Zelllinie I38-4 erfolgreich war. In den Infektionen fünf und sechs fanden die Gene ID-1, ID-2 und Fos Verwendung, die der detektierten Genkombination der Infektion I38-3 entsprechen. Zur Infektion sieben und acht wurden die Gene Fos, ID-1 und Nanog eingesetzt. In den Infektionen neun und zehn wurde die komplette Genbank, bis auf diejenigen Gene verwendet, die nie oder nur sehr selten im Zusammenhang einer Immortalisierung in unserer Arbeitsgruppe detektiert werden konnten. Zu der Transduktion der Infektionen elf und zwölf wurde dieses Set noch zusätzlich um die starken Immortalisierungsgene reduziert (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Infektionen der PBEC Zellen

		2x		2x		2x		2x		2x		
Nr.	Gene	Inf 3	Inf 4	Inf 5	Inf 6	Inf 7	Inf 8	Inf 9	Inf 10	Inf 11	Inf 12	GFP
1	Id2											
2	Fos											
3	NS1											
4	Jun											
5	E2F1											
6	βCat											
7	TA _g											
8	Myb											
9	Id3											
10	E7											
11	E6											
12	Bcl2											
13	HoxA9											
14	Bmi1											
15	PymT											
16	Core											
17	Oct3											
18	Klf4											
19	Id1											
20	Myc											
21	Lmo2											
22	Nfe2L2											
23	Yap1											
24	Nanog											
25	Sox2											
26	RhoA											
27	Ezh2											
28	Gli1											
29	v-Myc											
30	Sez12											
31	ZFP217											
32	Id4											
33	Rex											
Zelllinie		nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein
cum. PDL		15,4	19,9	15,4	24,6	25,3	23,6	45,3	28,8	23,6	25,2	8,2
Tage in Kultur		106	126	106	106	106	106	126	126	106	126	85

Es konnten die zwei PBEC-Ziellinien 9 und 10 generiert werden (siehe Tabelle 10 und Abbildung 15). Die GFP-Kontrollinfektion starb bereits nach 85 Tagen in Kultur im Vergleich zu den Linien, deren Expansion nach 126 Tage eingestellt wurde (siehe Tabelle 10 und Abbildung 15). In Linie 9 konnten die Gene TAg, Core und Rex detektiert werden und in Linie 10 die Kombination aus ID-2 und Rex (siehe Tabelle 10).

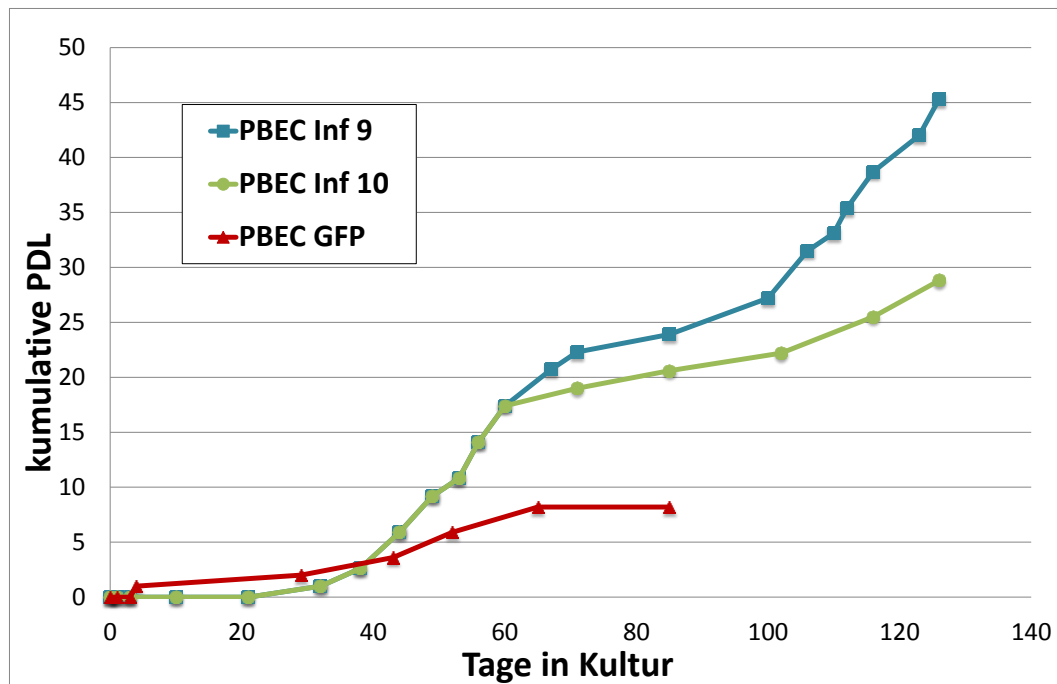


Abbildung 15: Kumulative Populationsverdopplung der PBEC-Infektionen

Dargestellt sind die kumulativen Populationsverdopplungen über die Tage in Kultur der PBEC Infektion 9 und Infektion 10. Zum Vergleich der Lebensdauer und Proliferationsstärke ist die kumulative Populationsverdopplung der GFP-Kontrollinfektion in Rot dargestellt. Die Expansion der Zelllinien wurde nach 126 Tagen eingestellt. Die Kontrollinfektion hörte bereits nach 65 Tagen in Kultur und einer cPDL von 8,2 auf zu proliferieren und starb nach 85 Tagen in Kultur.

3.4 Funktionale Immortalisierung und physiologische Relevanz

In Abschnitt 3.3 wurde dargestellt, wie Genkombinationen gefunden werden konnten, die einer Zellliniengenerierung dienen. Eine Zelllinie aus den unterschiedlichen primären Endothel-Zelltypen zu generieren war das erste Ziel dieser Arbeit. Das zweite und viel komplexere Ziel ist es jedoch, physiologisch relevante Zelllinien zu generieren, deren primärer Phänotyp trotz Immortalisierung erhalten bleibt. Um zu beurteilen, ob die generierten Zelllinien der unterschiedlichen Endothel-Zelltypen diesem Anspruch gerecht werden, wurden sie, wie bereits in Abschnitt 3.3 erwähnt, einer breiten funktionellen Charakterisierung unterzogen. Dabei wurde darauf geachtet, durch die Charakterisierung viele unterschiedliche Eigenschaften abzudecken, wie zum Beispiel die Expression endothelspezifischer Marker, die Funktionsfähigkeit intrazellulärer Signalwege und die Zellfunktionalität *in vitro* sowie *in vivo*. Um die physiologische Relevanz der in dieser Arbeit generierten Zelllinien zu beurteilen, wurden sie während der Charakterisierung mit den entsprechenden primären Zellen verglichen, da primäre Zellen der *in vitro* Goldstandard für physiologische Relevanz sind. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Charakterisierung beispielhaft anhand der Resultate der Zelllinie HUVEC I38-2 (im Folgenden als immo. HUVEC bezeichnet) und der HMVEC Linie I46-12 (im Folgenden als immo. HMVEC bezeichnet) im

Vergleich zu den entsprechenden primären Zellen vorgestellt. Diese beiden Zelllinien wurden als Beispiel ausgewählt, da sie den besten Phänotyp und die besten Eigenschaften während der Charakterisierung im Vergleich zu den primären Zellen und den anderen Zelllinien ihres Zelltyps aufweisen.

3.4.1 Morphologie der Endothelzellen

Sowohl die HUVEC-Linie I38-2 als auch die HMVEC-Linie I46-12 weisen die typische Kopfsteinpflaster-ähnliche Morphologie der primären HUVEC-Zellen auf (siehe Abbildung 16).

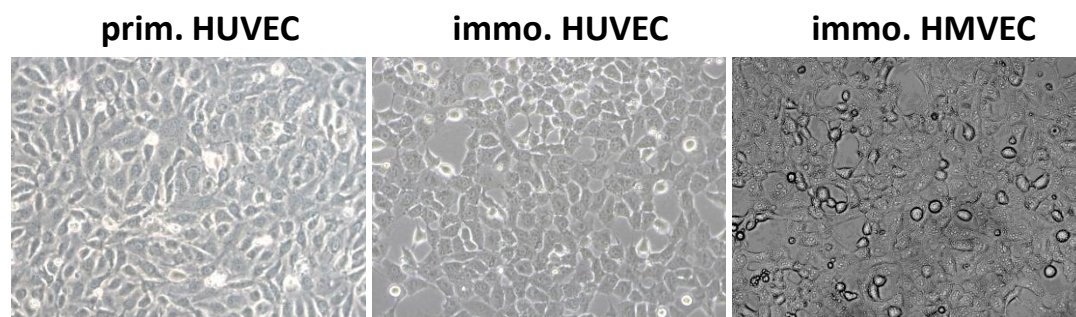


Abbildung 16: Morphologie der unterschiedlichen Endothelzellen

Mikroskopie-Aufnahme in 20facher Vergrößerung von primären HUVEC-Zellen, der immortalisierten HUVEC-Zelllinie I38-2 und der immortalisierten HMVEC-Zelllinie I46-12.

3.4.2 Endothelspezifische Oberflächenmarker

Endothelspezifische Oberflächenmarker sind Rezeptoren auf der Zelloberfläche, deren Expression spezifisch für Endothelzellen ist. Anhand des Nachweises der Kombination dieser Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen der unterschiedlichen Linien, kann belegt werden, dass es sich um eine endotheliale Zelllinie handelt. Außerdem geben diese Untersuchungen einen ersten Hinweis, ob trotz Immortalisierung der Differenzierungsstatus des Zelltyps erhalten geblieben ist und keine Dedifferenzierung stattgefunden hat. Durch den Vergleich der Zelllinien mit den entsprechenden primären Zellen in Bezug auf die Expressionshöhe der Marker sollte untersucht werden, wie ähnlich sich die immortalisierten Endothelzellen gegenüber den primären Zellen verhalten, also wie physiologisch relevant die Linien sind. Die Untersuchung der Expression der Oberflächenmarker wurde anhand von FACS-Analysen durchgeführt, wie bereits in 2.4.2.1 beschrieben. Die Analyse wurde zu mehreren Zeitpunkten der Kultivierung wiederholt, um zu beurteilen, ob die Expression stabil bleibt oder sich im Verlauf der Expansion verändert oder vielleicht sogar verloren geht. Die FACS-Analyse wurde daher als Mittel der Evaluation ausgewählt, da sie schnell und einfach durchzuführen ist und verlässliche Ergebnisse liefert.

3.4.2.1 Der endotheliale Thrombocyten-Adhäsions-Rezeptor-1 PECAM-1

Der Rezeptor PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) wird auch als CD31 (cluster of differentiation 31) bezeichnet (Ferrero et al. 1995). PECAM-1 ist ein wichtiger Bestandteil der intercellular junctions der Endothelzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Leukozyten Transmigration aus der Blutbahn in tieferliegende Gewebe auf der parazellulären Route der Endothelzellen (siehe Abbildung 21).

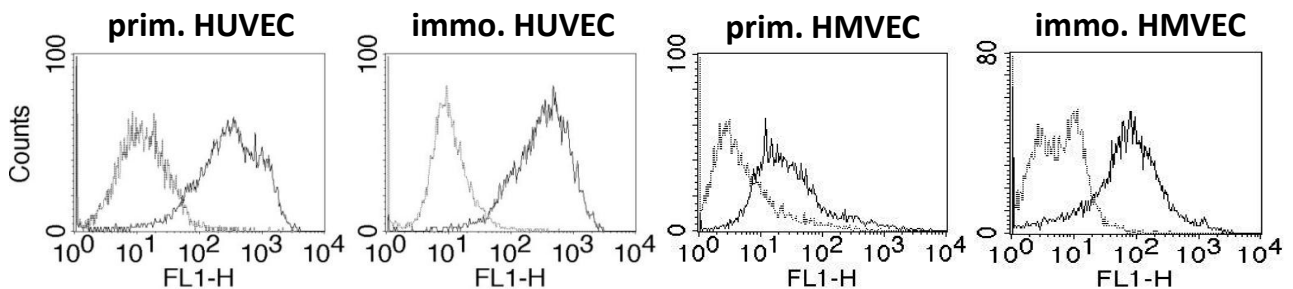


Abbildung 17: Expression des Oberflächenmarkers PECAM-1

Die Expression von PECAM-1 wurde mittels Durchflusszytometrie sowohl auf primären (prim. HUVEC und prim. HMVEC) als auch auf den entsprechenden immortalisierten Zelllinien (immo. HUVEC und immo. HMVEC) analysiert (dunkelgrau). Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen (hellgrau).

Die Analyse der CD31-Expression wurde zu mehreren Zeitpunkten der Kultivierung mit dem Zellpool der entsprechenden Linie und den primären Zellen wiederholt. In Abbildung 17 sind beispielhaft die Ergebnisse der primären HUVECS bei einer kumulativen PDL von 9,6 und 24 Tagen, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 99 und 166 Tagen, der primären HMVEC bei einer kumulativen PDL von 5,2 und 27 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 43,8 und 88 Tagen in Kultur dargestellt. Sowohl die HUVECS als auch die HMVECS weisen im Vergleich zu ihren primären Zellen eine ähnlich hohe und Expression dieses Markers auf. Des Weiteren fällt auf, dass die primären HMVECS bereits nach kurzer Kultivierungsdauer (cPDL von 5,2) eine heterogene Expression von CD31 aufweisen, wohingegen die Zelllinie nach längerer Kultivierung (cPDL 43,8) eine homogene Expression dieses Markers aufweist.

3.4.2.2 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor-2

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2; VEGFR-2) auch bekannt als CD309 (Cluster of Differentiation 309) ist eine Typ-III Rezeptor Tyrosin-Kinase (Shibuya, Ito and Claesson-Welsh 1999). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) bindet an VEGFR-2 auf der Zelloberfläche und induziert dabei dessen Dimerisierung und Aktivierung durch Transphosphorylation.

Die Aktivierung von VEGFR-2 führt zu Vaskulogenese oder aber zu Angiogenese und ist deren Hauptkontributor. Die Vaskulogenese bezeichnet dabei die Neubildung von Gefäßstrukturen durch im Blut zirkulierende Angioblasten, die dadurch zu de-novo Endothelzellen differenzieren (siehe 1.5.1.1). Die Vaskulogenese spielt insbesondere bei der Entwicklung des Gefäßsystems während der Embryogenese eine wichtige Rolle. Die Angiogenese hingegen bezeichnet das Wachstum neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen durch Sprossung (siehe 1.5.1.2). Daher findet Angiogenese vornehmlich im adulten Stadium statt und ist zum Beispiel während der Wundheilung essentiell.

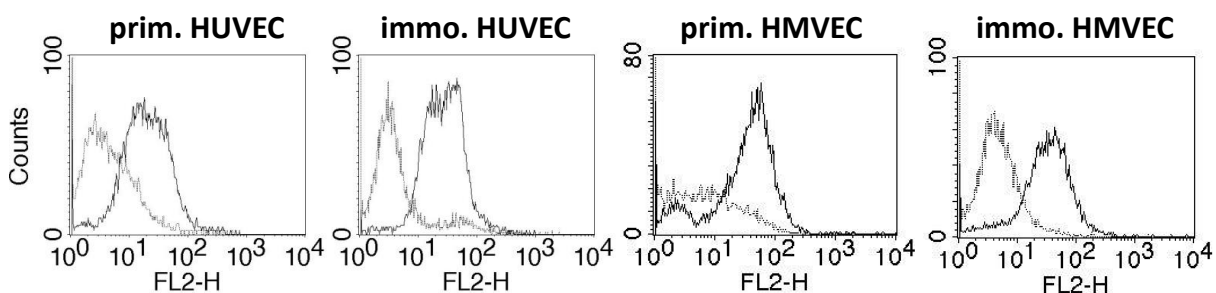


Abbildung 18: Expression des Oberflächenmarkers VEGFR-2

Die Expression von VEGFR-2 wurde mittels Durchflusszytometrie sowohl auf primären (prim. HUVEC und prim. HMVEC) als auch auf den entsprechenden immortalisierten Zelllinien (immo. HUVEC und immo. HMVEC) analysiert (dunkelgrau). Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen (hellgrau).

Des Weiteren induziert die Aktivierung von VEGFR-2 über VEGF eine massive, Tyrosinkinase vermittelte Signalkaskade in Endothelzellen (Holmes et al. 2007). Dadurch wird die Produktion von Faktoren stimuliert, die die Gefäßpermeabilität (eNOS/NO), Migration (ICAMs/VCAMs/Matrix-Metalloprotein-asen MMPs), Proliferation (Fibroblast growth factor FGF1 und bFGF) und schließlich die Differenzierung in mature Blutgefäße regulieren. Die Analyse der VEGFR-2 Expression wurde zu mehreren Zeitpunkten der Expansion analysiert. In Abbildung 18 sind beispielhaft die Ergebnisse der primären HUVECS bei einer kumulativen PDL von 9,6 und 24 Tagen, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 99 und 166 Tagen, der primären HMVEC bei einer kumulativen PDL von 5,2 und 27 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 43,8 und 88 Tagen in Kultur dargestellt. In Bezug auf die Expression dieses Rezeptors verhalten sich sowohl die HUVEC- als auch die HMVEC-Linien wie ihre entsprechenden primären Zellen.

3.4.2.3 Die TIE-Rezeptoren

TIE-Rezeptoren (Tyrosinkinase mit Immunoglobulin-ähnlicher und EGF-ähnlicher Domäne) sind Angiopoietin-Rezeptoren. Angiopoietine 1-4 sind Wachstumsfaktoren die Angiogenese vermitteln und essentiell für die Formation maturer Blutgefäße sind.

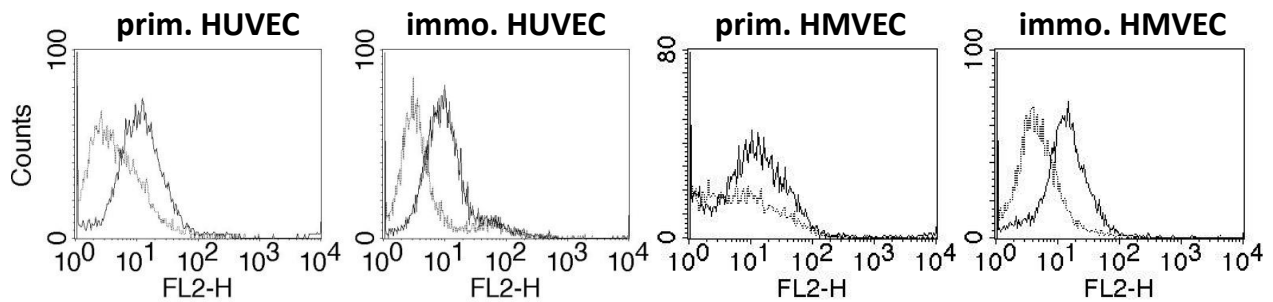


Abbildung 19: Expression des TIE-1-Rezeptors auf der endothelialen Oberfläche

Die Expression des TIE-1-Rezeptors wurde mittels Durchflusszytometrie sowohl auf primären (prim. HUVEC und prim. HMVEC) als auch auf den entsprechenden immortalisierten Zelllinien (immo. HUVEC und immo. HMVEC) analysiert (dunkelgrau). Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen (hellgrau).

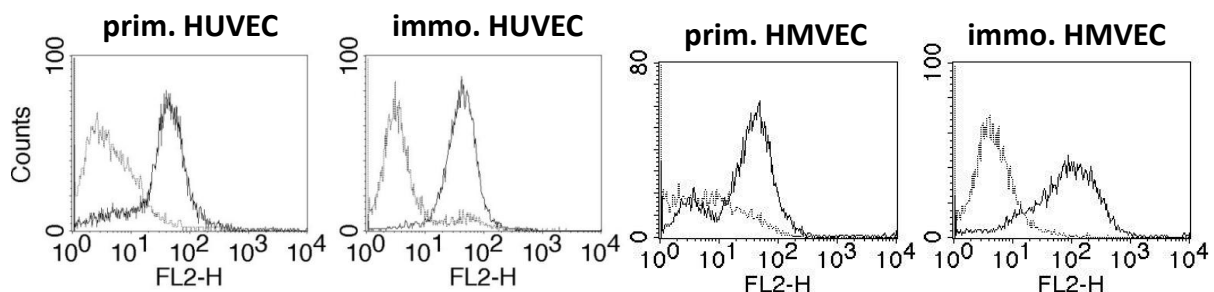


Abbildung 20: Expression des TIE-2-Rezeptors auf der endothelialen Oberfläche

Dargestellt ist die Expression des TIE-2-Rezeptors, die mittels Durchflusszytometrie sowohl auf primären (prim. HUVEC und prim. HMVEC) als auch auf den entsprechenden immortalisierten Zelllinien (immo. HUVEC und immo. HMVEC) analysiert (dunkelgrau) wurde. Als Negativkontrolle dienten die entsprechenden ungefärbten Zellen (hellgrau).

Ang 1 wird konstitutiv von den Endothel-ummantelnden Perizyten produziert und freigegeben. Ang 2 wird von den Endothelzellen selbst in den Weibel-Palade-Bodies produziert und durch einen inflammatorischen Stimulus in die Peripherie sekretiert. Die Angiopoietine binden dabei an den extrazellulären N-Terminus der TIE-Rezeptoren und aktivieren dadurch die Tyrosinkinase-Domäne. Die Tyrosinkinase am intrazellulären C-Terminus führt dann die Phosphorylierung der Schlüssel-Tyrosin-Reste von Proteinen durch und aktiviert somit das Zell-Signaling. Durch die daraus resultierenden Signalkaskaden wird letztendlich zum Beispiel Zellwachstum induziert. Auf der Oberfläche von Endothelzellen werden zwei Typen der TIE-Rezeptoren expremiert (Sato et al. 1995). Bis heute werden die Funktionen der einzelnen Rezeptoren kontrovers diskutiert. Einige Publikationen konnten eine Signalvermittlung über den TIE-1-Rezeptor nachweisen jedoch ist seine Funktion noch wenig untersucht (Chan and Sukhatme 2009, Li et al. 2010). Man vermutet, dass die Mehrzahl der Signale von dem TIE-2-Rezeptor transmittiert wird (Fukuhara et al. 2008). Wenn Ang 1 an den extrazellulären N-Terminus von TIE-2 bindet, wird unter anderem der

PI3K/Akt Signalweg aktiviert. Des Weiteren werden anti-inflammatorische Effekte induziert, durch das blocken der Expression von Adhäsionsmolekülen für die Leukozyten-Rekrutierung. Zusätzlich hat das Binden von Ang 1 an TIE-2 eine gefäßstabilisierende Wirkung, da die Zell-Zell-junctions der Endothelzellen untereinander verbessert werden. All die Effekte von Ang 1 können durch das alternative Binden von Ang 2 an TIE-2 geblockt werden.

Die Abbildung 19 und die Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der primären HUVECS bei einer kumulativen PDL von 9,6 und 32 Tagen, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 56,4 und 109 Tagen, der primären HMVEC bei einer kumulativen PDL von 6,8 und 42 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 50,4 und 100 Tagen in Kultur. Sowohl die HUVEC-Linien als auch die HMVEC-Linien exprimieren die TIE-Rezeptoren in der gleichen Größenordnung wie ihre entsprechenden primären Zellen (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20).

3.4.2.4 Inflamationsabhängige Oberflächenmarker

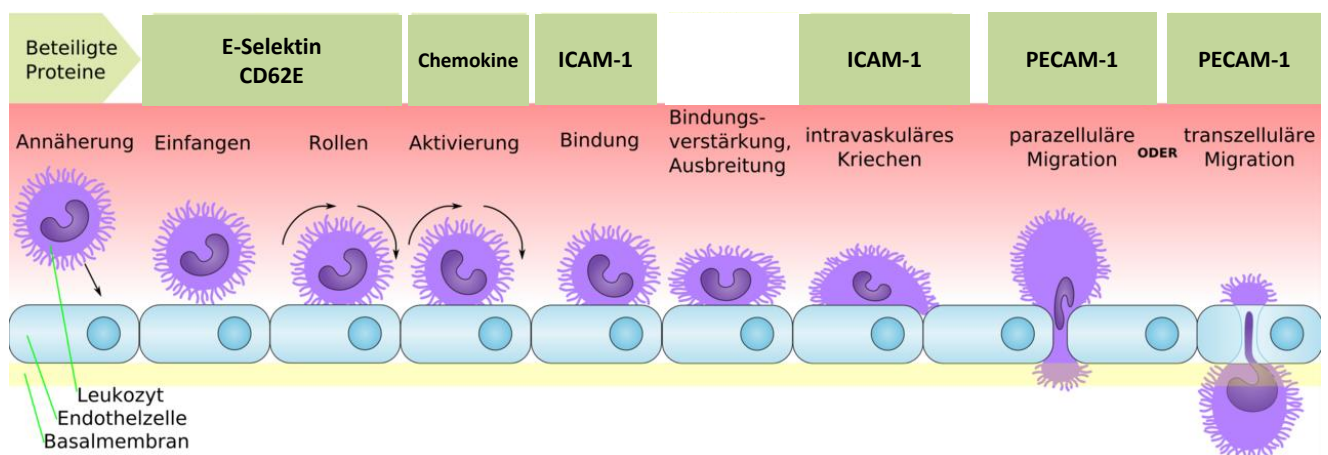


Abbildung 21: Die Leukozyten-Endothel Adhäsionskaskade

Während einer Inflammation induziert das Zytokin TNF- α die Expression der inflammationsabhängigen Oberflächenmarker Selektin CD62E, ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) auf der Oberfläche der Endothelzellen. Dadurch werden Leukozyten aus dem Blutstrom „gefangen“, ihr „rollen“ auf der Endotheloberfläche induziert und die Transmigration durch die Endothelschicht veranlasst, um an den Ort der Inflammation in tieferliegenden Geweben zu gelangen. Abbildung verändert nach (von Andrian and Mackay 2000).

Neben der Blutgefäßneubildung nimmt das Endothel eine wichtige Funktion während Entzündungsprozessen ein (Weber et al. 2007). Während einer Inflammation werden Zytokine, wie z.B. TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) von T-, B- und NK-Zellen produziert und ausgeschüttet. Des Weiteren wird TNF- α lokal von verletztem Gewebe abgegeben und wirkt auf die Endothelzellen von benachbarten Blutgefäßen. Das Zytokin TNF- α trifft auf die Endothelzellen und diese reagieren mit der Expression der inflammationsabhängigen

Oberflächenmarker Selektin CD62E, ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) auf der Oberfläche der Endothelzellen. Ziel der Expression der drei Marker während einer Inflammation ist es, Leukozyten aus dem Blut zu rekrutieren, an das Endothel zu binden und eine transendotheliale Migration der Leukozyten in tiefere Gewebeschichten zu ermöglichen, um dort die Entzündung zu bekämpfen (siehe Abbildung 21).

3.4.2.4.1 Selektine CD62

Selektine (von „select“ und „Lektin“), auch bezeichnet als CD62 (Cluster of Differentiation 62) sind eine Familie der CAMs (Cell Adhesion Molecules) (Smith, Olson and Ley 2004). Alle Selektine sind Transmembran-Glykoproteine, die wie Lektine wirken, also Zelladhäsionsproteine sind, die Zucker-Polymere binden. Es gibt drei Klassen der Selektine: E-Selektin (auf Endothelzellen), L-Selektin (auf Leukozyten) und P-Selektin (auf Blutplättchen (Platelets) und Endothelzellen). Während einer Entzündungsreaktion stimulieren Zytokine wie TNF- α die Expression von E-Selektin und P-Selektin. Dabei findet die Expression von P-Selektin bereits nach einigen Minuten post Stimulation statt, da es in intrazellulären Lagern der Endothelzelle gespeichert wird und schnell auf die Oberfläche transportiert werden kann. E-Selektin hingegen wird erst vier Stunden nach Stimulation auf der Oberfläche expremiert, da es nur bei Bedarf produziert wird. Die Expression der Selektine induziert die Rekrutierung der Leukozyten aus der Blutbahn und das „rollen“ auf der Oberfläche der Endothelzellen (siehe Abbildung 21), indem die Selektine an Karbohydrat-Gruppen der Liganden auf der Leukozytenoberfläche binden und diese somit aus der Blutbahn „fangen“ und auf der Endothelschicht verlangsamen (Issekutz and Issekutz 2002, Gehad et al. 2012). Dabei ermöglicht die geringe Bindungsaffinität der Selektine zu den Zucker-Polymeren das charakteristische rollen der Leukozyten, indem temporäre Verbindungen geknüpft und wieder gebrochen werden.

In dieser Arbeit wurde die Expression von E-Selektin (CD62E = CD62 antigen-like family member E) untersucht, da es ausschließlich auf Endothelzellen expremiert wird. Die Analyse der Expression von CD62E wurde mehrmals während der Kultivierung der Zelllinien wiederholt, wobei wie in 2.4.2.2 bereits beschrieben vorgegangen wurde. In Abbildung 22 sind beispielhaft die Ergebnisse der primären HUVECS bei einer kumulativen PDL von 8 und 20 Tagen Kultivierungsdauer, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 37,6 und 71 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 47,1 und 93 Tagen in Kultur dargestellt. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, können sowohl die HUVEC- als auch die HMVEC-Linien trotz Immortalisierung durch TNF- α zur Expression von CD62E stimuliert werden und weisen dabei eine vergleichbar hohe Expression wie die primären HUVEC Zellen auf. Die Analyse der primären Zellen wurde durch das geringe Proliferationspotential dieser Zellen erschwert, da zum Zeitpunkt der Analyse nur wenig primäres Zellmaterial zur Verfügung stand. Somit konnten nur sehr wenige Zellen von den primären HUVEC analysiert

werden, wodurch die Ergebnisse starken Schwankungen unterlagen. Trotz dieser Schwankungen konnte aber eindeutig festgestellt werden, dass die HUVEC-Zellen, sowohl die primären, als auch die Linie I38-2 eine heterogene Expression von CD62E aufweisen. Die Hälfte der Population exprimiert trotz Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ kein CD62E auf seiner Oberfläche und verhält sich daher wie die ungefärbte, unstimulierte Kontrolle. Die andere Hälfte der HUVEC-Population weist nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation eine Expression dieses Markers auf. Dahingegen zeigt die HMVEC-Linie I46-12 nach Stimulation eine homogene Expression des Markers, jedoch ist diese geringer im Vergleich zu den aktivierten HUVEC-Zellen.

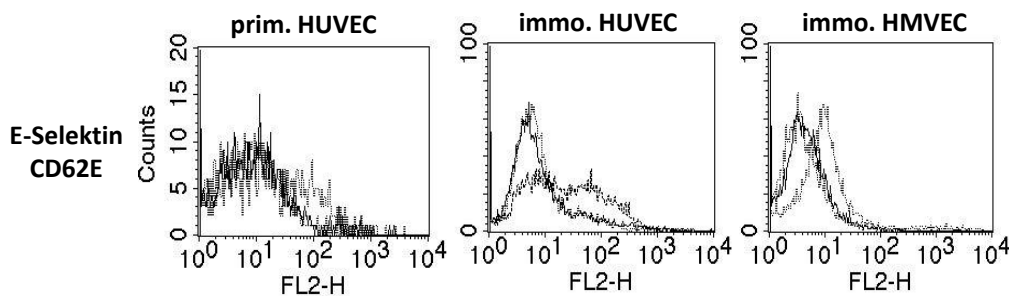


Abbildung 22: Expression des durch Inflammation induzierbaren Oberflächenmarkers E-Selektin

Analyse der CD62E Expression mit Hilfe der Durchflusszytometrie von primären HUVECs im Vergleich zu den Zelllinien HUVEC I38-2 und HMVEC I46-12. Der jeweils erste Peak der Graphen stellt die Messung der ungefärbten, unstimulierten Zellen des entsprechenden Zelltyps dar, der jeweils zweite Peak zeigt die unstimulierten und gefärbten Zellen und der dritte Peak stellt die Expression von CD62E nach vier Stunden der Stimulation durch 25ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ für den entsprechenden Zelltyp dar.

3.4.2.4.2 Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 ICAM-1 CD54

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1, CD54), ist ein Transmembran-Glykoprotein, das auf Endothelzellen und Zellen des Immunsystems expremiert wird (Kyan-Aung et al. 1991). Als interzelluläres Adhäsionsmolekül ist es in geringen Konzentrationen konstant auf den Membranen von Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten vorhanden. Durch Zytokin-Stimulation (hier 25ng/ml $\text{TNF-}\alpha$) im Falle einer Inflammation wird seine Konzentration verstärkt. ICAM-1 ist dabei ein Ligand für den LFA-1 (Leukocyte Function associated Antigen-1) Integrinrezeptor der Leukozyten. ICAM-1 bewirkt dabei den Arrest der Leukozyten nach deren Rollen auf der Endotheloberfläche und die intravaskuläre Migration. Durch die Bindung von ICAM-1/LFA-1 heften sich die Leukozyten an die Endothelzellen an (siehe Abbildung 21) und können dann aus der Blutbahn in das Gewebe transmigrieren um die dort befindliche Inflammation zu bekämpfen.

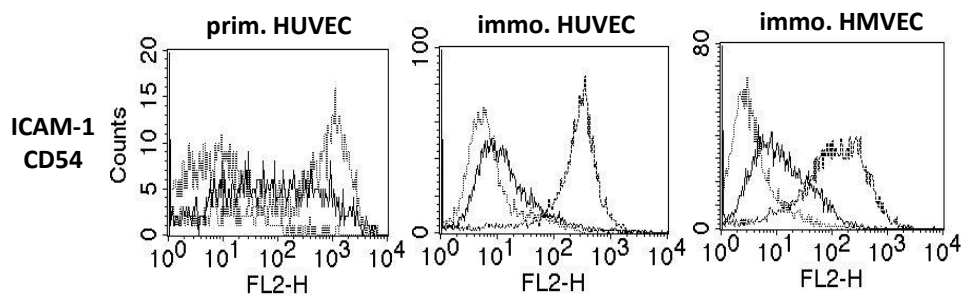


Abbildung 23: Expression des durch Inflammation induzierbaren Oberflächenmarkers ICAM-1

Durchflusszytometrie der CD54 Expression von primären HUVECs im Vergleich zu den Zelllinien HUVEC I38-2 und HMVEC I46-12. Die hellgraue Linie stellt die unbehandelte Kontrolle dar, die dunkelgraue Linie zeigt die unstimulierten und gefärbten Zellen und die gestrichelte Linie zeigt die Expression von CD106 nach der Stimulation durch 25ng/ml TNF- α .

Die Expression von CD54 der Zelllinien wurde analysiert, wobei wie in 2.4.2.2 beschrieben vorgegangen wurde. In Abbildung 23 sind beispielhaft die Ergebnisse der primären HUVECS bei einer kumulativen PDL von 8 und 20 Tagen, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 37,6 und 71 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 47,1 und 93 Tagen in Kultur dargestellt. Die in dieser Arbeit generierten Zelllinien und ihre primären Zellen wurden mit 25ng/ml TNF- α stimuliert und ihre Reaktion nach vier Stunden auf diesen Stimulus untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass sowohl bei den primären Zellen als auch den Zelllinien eine Erhöhung der CD54 Expression nach Stimulation erfolgt (Abbildung 23). Jedoch wird deutlich, dass die primären HUVECs bereits zu dem Zeitpunkt einer kumulativen PDL von 8 eine sehr heterogene Population in Bezug auf die Expression von CD54 aufweisen und sie bereits im unstimulierten Zustand eine signifikante Menge an CD54 exprimieren (dunkelgraue Linie). Dies deutet darauf hin, dass die primären Zellen sich in einem entzündeten Zustand befinden. Diese „Entzündung“ resultiert wahrscheinlich von seneszenten Zellen die sich mit steigender Kultivierungsdauer zunehmend in Primärzellkulturen befinden und für die bekannt ist, dass sie proinflammatorische Zytokine sekretieren. Im Vergleich dazu weist die HUVEC-Linie I38-2 nach 37,6 PDL unter allen untersuchten Bedingungen eine homogene Population auf. Im unstimulierten Zustand weist sie eine nur geringe Expression von CD54 auf (dunkelgraue Linie) und nach TNF α -Stimulation wird die Expression verstärkt (gestrichelte Linie). Auch die HMVEC Linie weist eine Verstärkung der CD54 Expression nach TNF α Stimulation auf, wobei ihre CD54 Expression im unstimulierten Zustand im Vergleich zu der HUVEC Linie leicht erhöht ist und weniger Zellen eine sehr hohe Expression nach Stimulation erreichen.

3.4.2.4.3 Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 VCAM-1 CD106

VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1, CD106) ist ein Zelladhäsionsprotein, dass erst nach Zytokin-Stimulation auf der Membran von Endothelzellen exprimiert wird. Dabei wird durch TNF- α Stimulation die Transkription von VCAM-1 erhöht, da der VCAM-1 Promotor funktionelle Tandem-Bindungssequenzen für NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) enthält und dessen mRNA anschließend stabilisiert wird. Einmal stimuliert, hält die Expression von VCAM 24 Stunden an. VCAM-1 ist ein Ligand der auf der Oberfläche von Leukozyten exprimierten Integrine und dient somit ebenfalls der Rekrutierung und Bindung von Leukozyten an die Endotheloberfläche (siehe Abbildung 21). Die Ergebnisse der Analyse der Expression von CD106 mit Hilfe des Durchflusszytometers sind in Abbildung 24 dargestellt. Beispielhaft werden die Ergebnisse der primären HUVECS bei einer kumulativen PDL von 8 und 20 Tagen, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 37,6 und 71 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 47,1 und 93 Tagen in Kultur gezeigt.

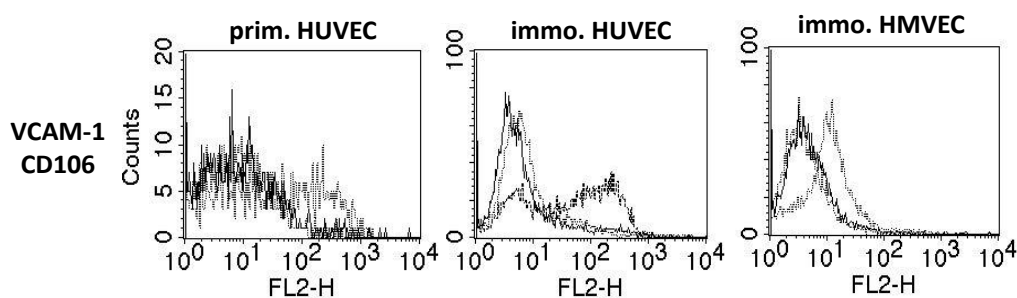


Abbildung 24: Expression des durch Inflammation induzierbaren Oberflächenmarkers VCAM-1

Analyse der CD106 Expression von primären HUVECs im Vergleich zu den Zelllinien HUVEC I38-2 und HMVEC I46-12. Die hellgraue Linie stellt die unbehandelte Kontrolle dar, die dunkelgraue Linie zeigt die unstimulierten und gefärbten Zellen und die gestrichelte Linie zeigt die Expression von CD106 nach der Stimulation durch 25ng/ml TNF- α .

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, können sowohl die HUVEC- als auch die HMVEC-Linien durch TNF- α zur Expression von CD106 stimuliert werden. Dabei weisen die HUVECs eine primär ähnliche Expressionsintensität auf, wobei die CD106 Expression in den adulten HMVECs im Vergleich zu den primären HUVEC Zellen leicht reduziert ist.

3.4.3 Funktionale Charakterisierung

Anhand der funktionalen Charakterisierung sollte untersucht werden, ob die generierten Zelllinien trotz Immortalisierung noch in der Lage sind komplexe Funktionen auszuführen, die ein intaktes intrazelluläres Zell-Signaling voraussetzen. Dabei wurde auch hier darauf geachtet, Funktionen aus den unterschiedlichsten endothelspezifischen Bereichen zur Untersuchung auszuwählen, um durch das Verhalten der Linien in der Summe der untersuchten Funktionen eine Aussage über ihre physiologische Relevanz treffen zu können.

3.4.3.1 Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein

Natives Low-Density-Lipoprotein (LDL) kann von allen Zellen über den transmembran LDL-Rezeptor durch Endozytose aufgenommen werden. Modifizierte LDL Formen, wie oxidiertes LDL (oxLDL) oder acetyliertes LDL (acLDL) werden hingegen ausschließlich über den acLDL-Rezeptor in die Zelle aufgenommen, der ein Scavengerrezeptor der Klasse A ist. Lediglich Endothelzellen, Kupfferzellen und Makrophagen sind in der Lage acLDL aufzunehmen und diesen Rezeptor zu exprimieren. Um die Aufnahme der Zellen von acLDL zu untersuchen, wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem acLDL behandelt, so dass die Aufnahme mittels Durchflusszytometrie analysiert werden konnte. Für jede zu untersuchende Linie oder primäre Zelle wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen im FACS auf ihre FITC-Fluoreszenz analysiert.

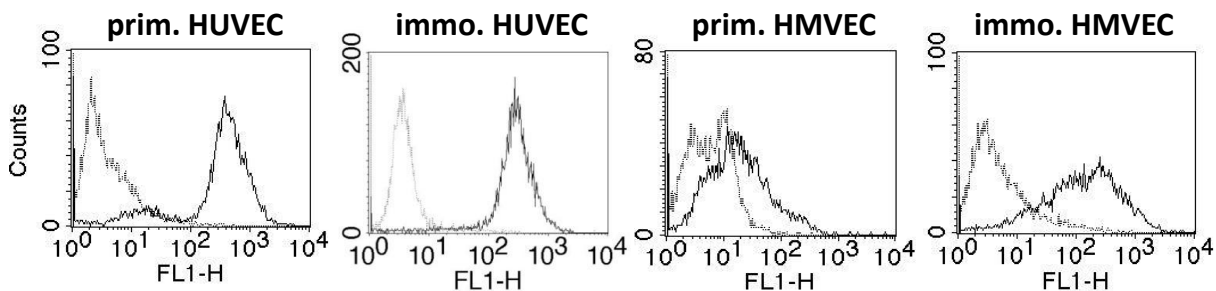


Abbildung 25: Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein

Dargestellt ist die FACS-Analyse der Aufnahme von acLDL in primären HUVECs im Vergleich zu der Zelllinie HUVEC I38-2 und den primären HMVECs im Vergleich zu der Linie HMVEC I46-12. Für die Analyse wurden die jeweiligen Zellen für vier Stunden mit 2 µg/ml (acetylated low-density lipoprotein from human plasma, BODIPY® FL conjugate; Molecular Probes/Invitrogen) verdünnt in Medium, im Dunkeln inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Die hellgraue Linie zeigt die negativ Kontrolle des entsprechenden Zelltyps und die schwarze Linie die Intensität der Fluoreszenz der Zelle, resultierend aus der Aufnahme von FITC-konjugiertem acLDL für den entsprechenden Zelltyp.

In Abbildung 25 sind beispielhaft die Ergebnisse der primären HUVECs bei einer kumulativen PDL von 6,4 und 16 Tagen, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 98,9 und 166 Tagen, den primären HMVECs bei einer kumulativen PDL von 6,8 und 33 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 43,8 und 88 Tagen in Kultur dargestellt. Die generierten Zelllinien sind in der Lage den funktionsfähigen acLDL-Rezeptor zu exprimieren und acLDL aktiv in die Zelle aufzunehmen (Abbildung 25). Dabei ist die Menge an aufgenommenem acLDL im gleichen Zeitraum in primären und immortalisierten HUVECs nahezu identisch. Bei den HMVECs sind die immortalisierten Linien im Vergleich zu den primären Zellen sogar in der Lage im gleichen Zeitraum mehr acLDL intrazellulär aufzunehmen.

3.4.3.2 Die Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) ist ein Enzym, das den Blutdruck reguliert. Sie ist hauptsächlich mit der Zellmembran der Endothelzellen assoziiert. Aufgrund ihrer Lipidanker wird sie gezielt zu den Caveolae an der Zellmembran transportiert, die den Ort der höchsten eNOS-Aktivität darstellen. Nach Aktivierung der eNOS kann es durch das Entfernen der Lipidanker zu einer Umverteilung des Enzymes in den Golgi-Apparat kommen. Die eNOS wird von den Endothelzellen konstitutiv exprimiert, ihre Transkription kann jedoch durch zahlreiche Reize und Botenstoffe verstärkt werden. Dazu zählen bestimmte Wachstumsfaktoren (VEGF, TGF- β 1) sowie Hormone (Insulin, Estrogen) als auch laminare Scherkräfte, die durch das Vorbeifließen des Blutes auf Endothelzellen ausgeübt werden (Cheng et al. 2005).

Allgemein muss die eNOS, um ihre Funktion auszuführen, aktiviert werden. Dabei wird die Aktivität der eNOS hauptsächlich über die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration reguliert (Chen et al. 2010). Steigt der Spiegel von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen, wird ein Komplex aus Ca^{2+} /Calmodulin gebildet der jeweils an eine inaktive eNOS bindet. Anschließend wird ein heterogenes Tetramer aus je zwei eNOS/ Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexen gebildet. Erst in dieser Konstellation ist die eNOS aktiv. Bei geringer Kalziumionenkonzentration kann die eNOS in seltenen Fällen auch alternativ durch Phosphorylierung aktiviert werden. Einmal aktiviert, katalysiert die eNOS die Oxidation der Aminosäure L-Arginin mit Hilfe von NADPH zu den Produkten NO und L-Citrullin in gleichen Mengen. NO diffundiert daraufhin aus der Endothelzelle in die benachbarten, das Gefäß umgebenden glatten Muskelzellen (SMC Smooth Muscle Cells). Dort aktiviert NO das Enzym lösliche Guanylatzyklase (GC), welches die Bildung des Botenstoffes zyclisches Guanosin-monophosphat (cGMP) aus Guanosinmonophosphat katalysiert. cGMP führt dann zu der Relaxation der SMCs und Vasodilatation der Gefäße. Über diesen komplexen Mechanismus reguliert die eNOS den Blutdruck (Schermyly et al. 2011, Bakris 2012).

Das von eNOS produzierte NO übt darüber hinaus noch zahlreiche andere wichtige physiologische Wirkungen aus und gilt daher als gefäßschützender Faktor und macht deutlich, dass eine Verringerung der NO-Produktion durch eine gestörte eNOS-Aktivität, die Entstehung von Gefäßerkrankungen begünstigt.

Die Aktivität der eNOS wird in der hier durchgeführten Analyse indirekt über die von ihr produzierte Menge an NO evaluiert. Der nicht-fluoreszierende Farbstoff DAF-2-diacetate wird dabei durch das produzierte NO in seine fluoreszierende Form DAF-FM umgewandelt. In den hier etablierten Zelllinien wurde die Aktivität der eNOS untersucht und in Abbildung 26 sind beispielhaft die Ergebnisse der primären HUVECs bei einer kumulativen PDL von 6,4 und 16 Tagen, der HUVEC Linie I38-2 bei einer kumulativen PDL von 98,9 und 166 Tagen, den primären HMVECs bei einer kumulativen PDL von 6,8 und 33 Tagen und der HMVEC Linie I46-12 bei einer kumulativen PDL von 43,8 und 88 Tagen in Kultur dargestellt. Wie in

Abbildung 26 dargestellt, weisen alle generierten Zelllinien eine Aktivität der eNOS auf und sind somit in der Lage, trotz Immortalisierung solch komplexe Vorgänge auszuführen. Im Vergleich der primären HMVECs mit der HMVEC-Linie I46-12 fällt jedoch auf, dass nur ein sehr geringer Anteil der Population der primären Zellen in der Lage ist eine höhere eNOS Aktivität auszuführen. Der Großteil der Zellpopulation weist keine Aktivität der eNOS auf und verhält sich wie die ungefärbte Kontrolle (siehe Abbildung 26).

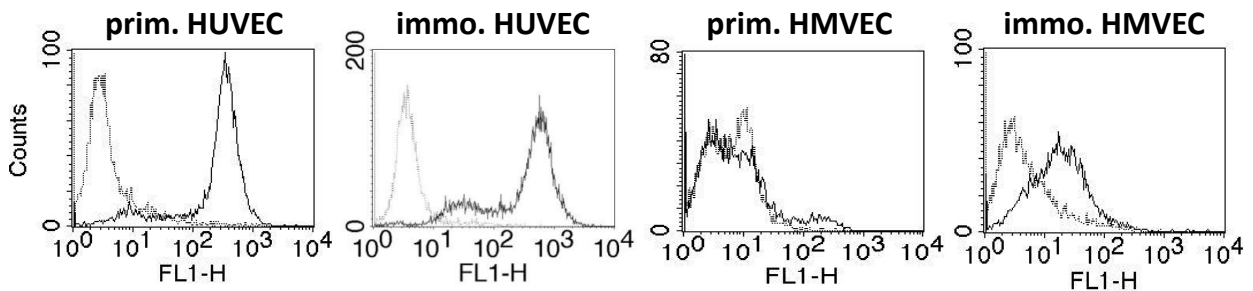


Abbildung 26: Aktivität der endothelialen NO-Synthase

Dargestellt ist die FACS-Analyse der Färbung des zellpermeablen DAF-2-DA (DAF-2-DA (4,5-Diaminofluorescein diacetate), cell permeable; Alexis Biochemicals), das durch die Anwesenheit von intrazellulärem NO in die fluoreszierende Form DAF-FM transformiert wird. Das intrazelluläre NO stammt dabei aus der Reaktion der aktiven eNOS mit L-Arginin. Somit ist der Nachweis von DAF-FM der indirekte Nachweis der Aktivität der eNOS. In der Abbildung sind primäre HUVECs im Vergleich zu der Zelllinie HUVEC I38-2 dargestellt und primäre HMVECs im Vergleich zu der Linie HMVEC I46-12. Die hellgraue Linie zeigt die negativ Kontrolle des entsprechenden Zelltyps und die schwarze Linie die Intensität der Fluoreszenz der Zelle.

3.4.3.3 Der Trans-Endotheliale Elektronen Widerstand

Der Trans-Endotheliale Elektronen Widerstand (TEER Trans-Endothelial Electron Resistance) gibt Auskunft über die Integrität des endothelialen Zelllayers. Er ergibt sich durch den Aufbau von Zellverbindungen („junctions“) benachbarter Endothelzellen. Diese Verbindungen haben die Aufgabe, das Gewebe zusammenzuhalten, den Zellzwischenraum zu verschließen, eine parazelluläre Barriere zu bilden und die Kommunikation von Zellen miteinander zu ermöglichen (Tsukita, Furuse and Itoh 2001, Matter and Balda 2003).

Die Zellkontakte werden im Wesentlichen durch Proteine gebildet, den Zelladhäsionsmolekülen. Je nach Endotheltyp unterscheidet sich die Zusammensetzung dieser Proteine und diktiert dadurch die Dichte oder Durchlässigkeit der parazellulären Barriere (Bazzoni 2006). Der Zellkontakt in manchen feinen Kapillaren ist zum Beispiel stark fenestriert und ermöglicht einen starken, kaum kontrollierten Stoffaustausch durch Diffusion. Im Gegenteil dazu bilden die Zellkontakte bei Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke eine sehr dichte Barriere. Durch die Zusammensetzung der Junction-Proteine kommt es hier nur zu einem kontrollierten, rezeptorvermittelten Stofftransport um das empfindliche Gehirn vor Toxinen und Pathogenen zu schützen.

Durch die Ausbildung solcher Barrieren kann ein elektrischer Widerstand gemessen werden der sich über die Endothelschicht aufbaut. Der TEER-Wert (in Ω/cm^2) hängt dabei von der gemessenen Ladung an zwei Elektroden ab, zwischen denen sich der Zelllayer befindet, und reflektiert die Menge an Elektronen die durch den Zelllayer fließen. Je größer der gemessene Widerstand desto dichter ist die endotheliale Barriere und somit der Zell-Zell-Kontakt, ermöglicht durch die Ausbildung von Tight-Junctions.

Für die Messung des TEERs wurde von jeder zu untersuchenden Zelllinie bzw. primären Zelle auf je drei Membranen je 2×10^5 Zellen ausgesät und die Messung in Triplikaten vorgenommen. Als Negativ-Kontrolle wurde bei jeder Messung eine gelatinisierte Membran ohne Zellen vermessen. Aus der Messung der Triplikate wurde der Mittelwert gebildet, von dem dann anschließend der gemessene Wert der Negativkontrolle subtrahiert wurde, um den wahren Widerstand der Endothelzellen zu bestimmen.

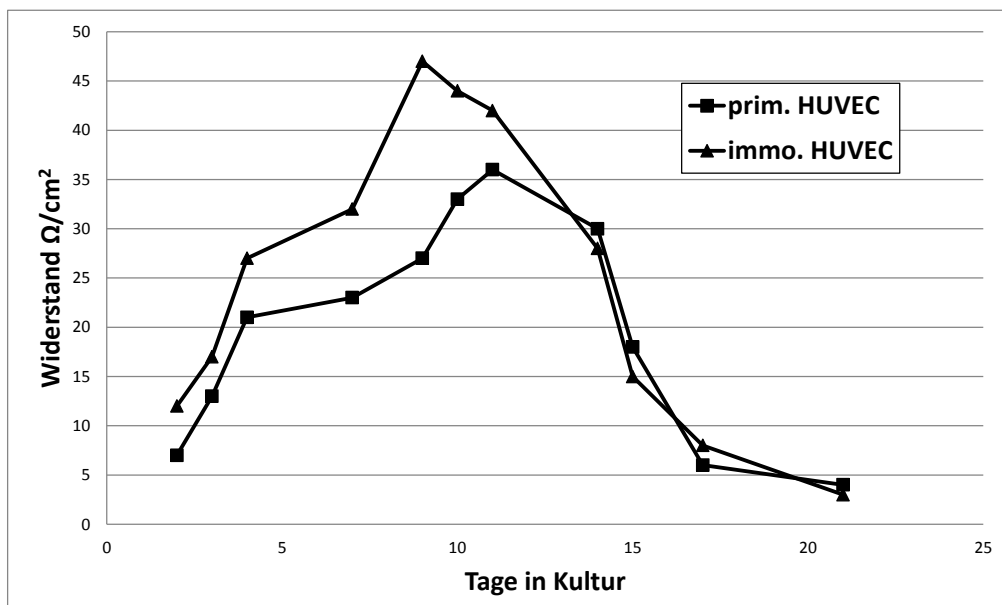


Abbildung 27: Messung des Trans-Endothelialen Widerstandes der HUVEC-Zellen

Die Messung wurde mit dem EVOMX Volttohmmeter und der EndOhm Messkammer (beide World Precision Instruments) durchgeführt. Je 2×10^5 Endothelzellen wurden auf gelatinisierten Transwell-Membranen (Corning Incorporated; Costar Transwell 3,0 μm Polycarbonate Membrane, 6,5mm Insert, 24 Well) kultiviert und die Messung wurde in Triplikaten vorgenommen. Als Negativ-Kontrolle diente eine Membran ohne Zellen.

Da jeder Endotheltyp, je nach Funktion in einem bestimmten Gewebe, eine spezifische Zusammensetzung der Junction-Protein-Arten aufweist, ergibt sich für jeden Endotheltyp auch ein spezifischer Wert des elektrischen Widerstandes. Für die hier generierten Zelllinien wurde dieser Widerstand gemessen und mit den Werten der primären Zellen und Literaturwerten verglichen. Für die HUVECs und HMVECs wird in der Literatur ein Widerstand von 30-50 Ω/cm^2 als physiologisch betrachtet. In der Abbildung 27 und Abbildung 28 ist die TEER-Analyse der HUVEC Linie I38-2 und der HMVEC Linie I46-12 zu sehen.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, entwickeln die immortalisierten HUVECs im Vergleich zu den primären Zellen zu einem früheren Zeitpunkt einen höheren TEER-Wert von $47 \Omega/\text{cm}^2$. Im Vergleich dazu entwickeln die primären HUVECs einen geringeren physiologischen TEER-Wert von $36 \Omega/\text{cm}^2$ zu einem späteren Zeitpunkt. Diese Analysen zeigen, dass sowohl der Verlauf in dem der TEER sich ausbildet als auch die maximale Werte zwischen den primären und immortalisierten Zellen sehr ähnlich verhalten.

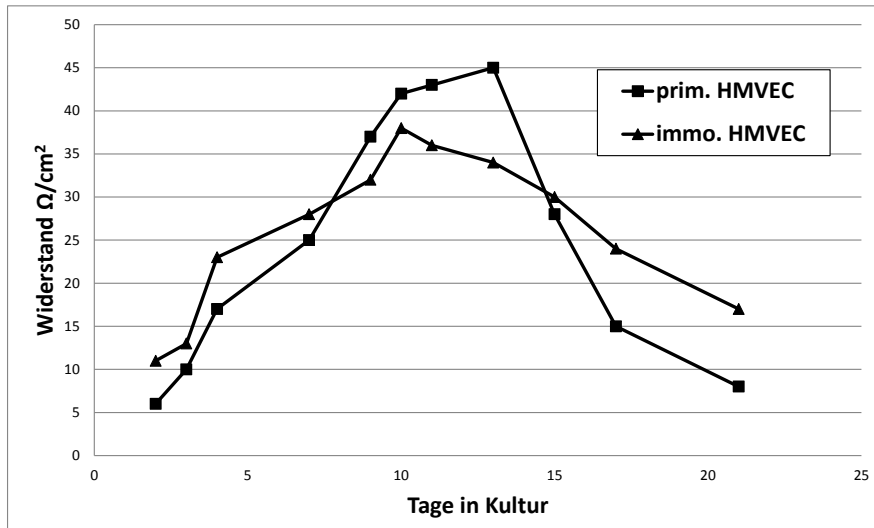


Abbildung 28: Messung des Trans-Endothelialen Widerstandes der HMVEC-Zellen

Die Messung wurde mit dem EVOMX Volttohmmeter und der EndOhm Messkammer (beide World Precision Instruments) durchgeführt. Je 2×10^5 Endothelzellen wurden auf gelatinisierten Transwell-Membranen (Corning Incorporated; Costar Transwell 3,0 μm Polycarbonate Membrane, 6,5mm Insert, 24 Well) kultiviert und die Messung wurde in Triplikaten vorgenommen. Als Negativ-Kontrolle diente eine Membran ohne Zellen.

Bei den adulten Zellen in Abbildung 28 entwickeln die Primären einen höheren TEER-Wert von $45 \Omega/\text{cm}^2$ im Vergleich zu den immortalisierten Zelllinien. Jedoch ist die Zelllinie I46-12 mit einem Wert von $38 \Omega/\text{cm}^2$ auch in der Lage einen vergleichbaren elektronischen Widerstand über der Zellschicht aufzubauen.

Dabei lässt sich in der Abbildung 27 und Abbildung 28 der typische Verlauf des TEER-Wertes beobachten. Die Zellen werden in Suspension auf die Membranen ausgesät und der TEER-Wert ist aufgrund der fehlenden Zell-Zell-Kontakte sehr gering. Der minimale angelegte Strom kann ungehindert durch den Zelllayer fließen, viele Elektronen passieren ungehindert die Membran und es wird ein nur schwacher Widerstand gemessen. Im Laufe der ersten Tage der Messung steigt der Teer-Wert stetig an, da die Zellen auf der Membran-Oberfläche anhaften und die Tight-Junction Proteine exprimieren, die den Zell-Zell-Kontakt herstellen und für die Integrität des Zelllayers sorgen. Dadurch kann der bei der Messung angelegte Strom nicht ungehindert fließen, die Elektronen werden an der Passage der Membran durch die Dichte der Zell-Zell-Kontakte gehindert und der gemessene Widerstand steigt an. Nach mehreren Wochen in Kultur nimmt der Teer-Wert wieder ab, da die Zellen durch die lange Kultivierung vermutlich teilweise sterben.

3.4.3.4 Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen durch Sprossung aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Potente et al. 2011). Sie ist dabei ein Prozess der während Wachstum, Entwicklung und Wundheilung stattfindet und der durch Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF1 und bFGF gesteuert wird (Chung, Lee and Ferrara 2010). Diese binden an die entsprechenden Rezeptoren der bereits vorhandenen Endothelzellen um sie zu aktivieren. Die aktivierten Endothelzellen setzen MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) frei, die das gefäßumgebende Bindegewebe degradieren und es den Endothelzellen erlauben, aus dem Verbund der Gefäßwand zu dissoziieren (Kalluri 2003). Anschließend wandern und proliferieren die Endothelzellen in die umgebende Matrix, indem sie chemotaktisch der Quelle des angiogenetischen Stimulus folgen (Adams and Alitalo 2007). Die dadurch neu entstandenen Kapillaren werden von SMCs und Pericyten umgeben, die durch die Stimulation von hauptsächlich FGF-1 und PDGF (Platelet Derived Growth Factor) sowie Ang1 rekrutiert werden.

3.4.3.4.1 Angiogenese *in vitro*

Der hier zur Charakterisierung durchgeführte Matrigel-Assay ermöglicht die Untersuchung der Endothelzellen auf ihre Fähigkeit zur Angiogenese *in vitro*. Das Matrigel besteht aus Strukturproteinen wie Laminin, Kollagen, Entaktin und Wachstumsfaktoren und ähnelt somit der natürlichen Umgebung des Endothels, wodurch es den Endothelzellen ermöglicht wird, komplexere gefäßähnliche Strukturen auszubilden. Pro Experiment wurden 4×10^4 Zellen auf dem Matrigel ausgesät. Bereits nach einigen Stunden (2-8h) konnte die Ausbildung von kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet werden, die mit Hilfe des Mikroskops untersucht und dokumentiert wurden (siehe Abbildung 29). Wie in Abbildung 29 ersichtlich, sind sowohl die HUVEC- als auch die HMVEC-Linien in der Lage Gefäß-ähnliche Strukturen zu bilden. Dies geschieht im gleichen Ausmaß wie bei den entsprechenden primären Zellen. Dabei gibt es zwischen den beiden Zelltypen Unterschiede. HUVEC-Zellen sind in der Lage eine robustere, stärker verzweigte Angiogenese durchzuführen, wohingegen die adulten HMVECs feinere vaskuläre Strukturen ausbilden.

Die Ausbildung dieser morphologisch unterschiedlichen kapillaren Netzwerke mag an der physiologischen Funktion der unterschiedlichen Zelltypen liegen. HUVECs sind makrovaskuläre Endothelzellen von embryonalem Ursprung. Primäre HUVECs weisen aufgrund ihrer embryonalen Herkunft im Vergleich zu anderen humanen Endothelzellen ein relativ hohes Proliferationspotential auf. Dies lässt sich auch an ihrem Verhalten während des Matrigel-Assays beobachten, indem sie ein viel stärker verzweigtes Netzwerk an kräftigeren Kapillaren bilden. HMVECs hingegen sind ausdifferenzierte Endothelzellen aus einem adulten Menschen. Daher weisen sie *in vitro* ein nur geringes Proliferationspotential auf, da es in einem gesunden adulten Organismus, außer während der Wundheilung, nur sehr wenig Notwendigkeit zur Angiogenese gibt. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die

in dieser Arbeit generierten Zelllinien in Bezug auf die Angiogenese und die morphologische Qualität der von ihnen ausgebildeten vaskulären Strukturen, wie ihre entsprechenden primären Zellen verhalten.

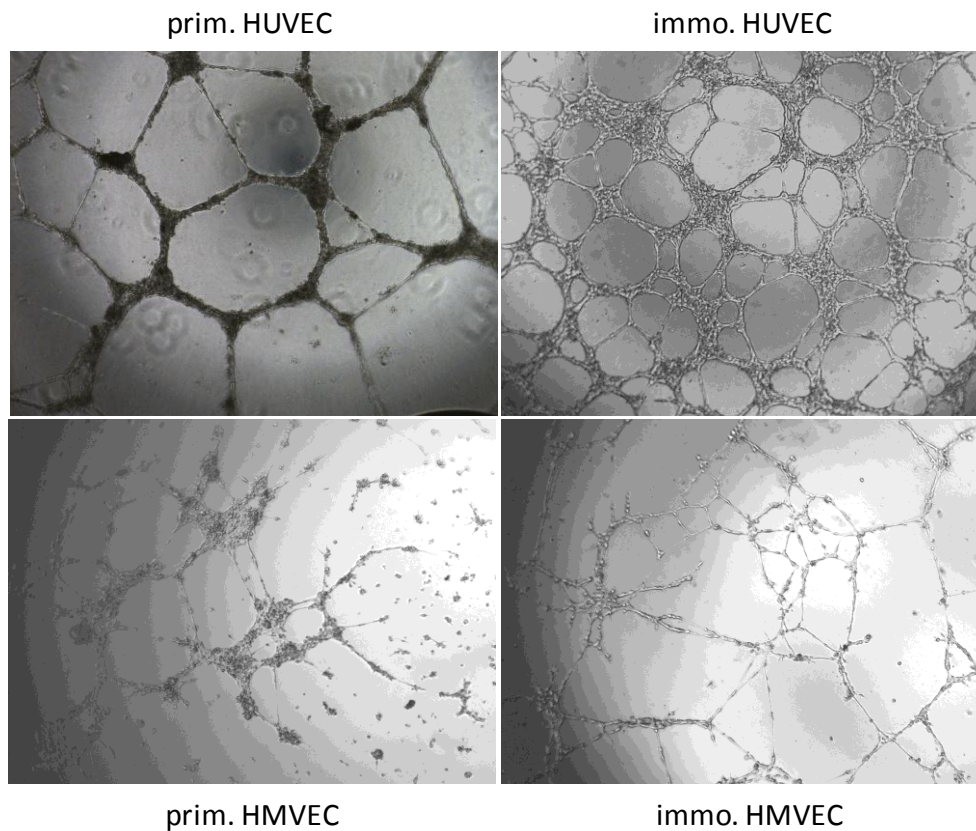


Abbildung 29: Matrigel-Assay zur Evaluierung der Angiogenese in vitro

Eiskaltes Matrigel wurde in flüssiger Form in 96 Lochplatten pipettiert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert, so dass das Matrigel fest wurde. Anschließend wurden 4×10^4 Zellen pro Experiment ausgesät. Nach 2-8h Inkubation, wurde die Ausbildung von kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet und mit Hilfe des Mikroskops dokumentiert.

3.4.3.4.2 Angiogenese *in vivo*

Laib *et al.* etablierten 2009 eine Methode zur Untersuchung der Angiogenese *in vivo* (Laib *et al.* 2009). Mit Hilfe dieses Sphäroid-basierten Transplantations-Assays kann das Angiogenese-Potenzial von Endothelzellen *in vivo* untersucht werden. Nachdem durch den Matrigel-Assay die Fähigkeit der in dieser Arbeit etablierten Zelllinien zur Angiogenese *in vitro* bestätigt wurde, war es als Nächstes interessant zu untersuchen, ob sie auch die Kapazität haben, Angiogenese *in vivo*, in diesem Falle in der Maus zu betreiben. Dazu wurden 10^4 Zellen der entsprechenden Zelllinie in eine Gelmatrix eingebettet und in hängenden Tropfen zu Sphäroiden kultiviert (Abbildung 30-A).

Anschließend wurden 100 dieser Spheroide in Matrigel eingebettet (Laib et al. 2009) und subkutan in die Flanken von in 8-12 Wochen alten immunodefizienten Rag-2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen injiziert. Diese Mäuse besitzen keine T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. Ihnen fehlt somit ein intaktes Immunsystem, wodurch sie ein optimaler Wirt für Xenotransplantate sind, da sie fremde Zellen nicht abtöten und abstoßen. Die transplantierten Zellen verbleiben somit in diesen Mäusen. Nach 14 Tagen wurden das Matrigel mit samt den eingebetteten Zellen aus den Mäusen re-isoliert (Abbildung 30-B), fixiert und einer histologischen Untersuchung unterzogen (Abbildung 31).

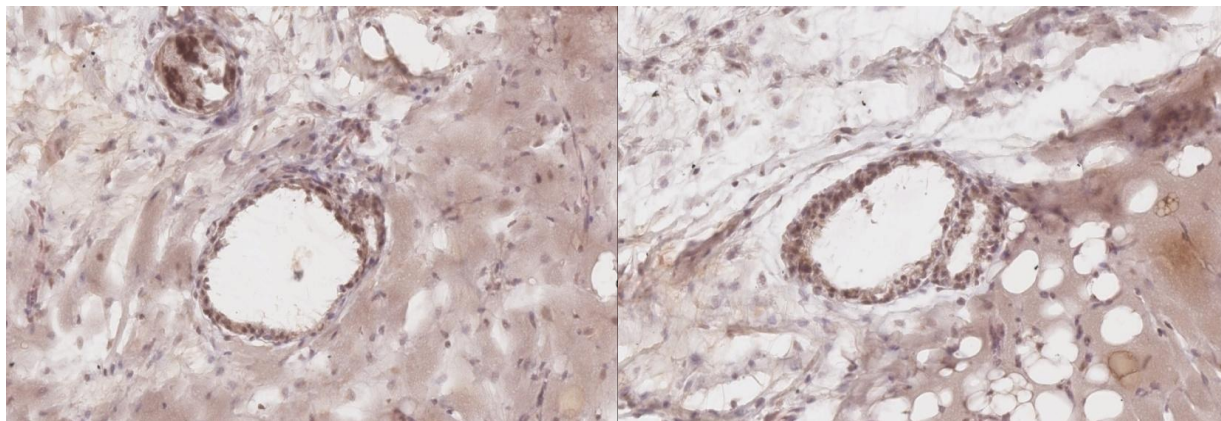


Abbildung 30: Etablierung von Endothelzellspheroide

(A): Endothelzellen wurden in Kulturmedium mit 0.25% (w/v) Methylzellulose über Nacht in hängenden Tropfen kultiviert. Unter diesen Konditionen formte sich aus den suspendierten Zellen ein einzelner Spheroide mit definierter Zellzahl von 10⁴ Zellen pro Tropfen (Protokoll nach (Korff et al. 2004).

(B): Die Spheroide wurden geerntet, gewaschen, zentrifugiert und mit 500μl Matrigel (growth factor reduced; BDBiosciences) und Fibrinogen (2 mg/ml finale Konzentration; Calbiochem) mit den Wachstumsfaktoren hVEGF und bFGF2 (je 500 ng/ml) gemischt. Dieses Gemisch wurde subkutan in die Flanken von 8-12 Wochen alten Rag-2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen injiziert. Die Matrigelplugs wurden nach 14 Tagen re-isoliert und über Nacht in Histofix fixiert.

Nach der Injektion des Matrigels können murine Zellen einwandern. Unter anderem können aufgrund der proangiogenen Umgebung des Matrigels auch murine Endothelzellen einwandern und ebenfalls gefäßähnliche Strukturen ausbilden. Daher wurden die Schnitte des ex-vivo re-isolierten Matrigels für humanes CD31 gefärbt (siehe Abbildung 31), so dass alle Endothelzellen humanen Ursprungs dunkelbraun gefärbt sind, und somit von den ungefärbten murinen Endothelzellen unterschieden werden können. Der Ring der (dunkelbraungefärbten) Endothelzellschicht humanen Ursprungs, bestehend aus den Endothelzellen der entsprechenden generierten Zelllinie, umgibt das Lumen des *in vivo* neugebildeten Gefäßes. Somit sind sowohl die HUVEC- als auch die HMVEC-Linien in der Lage ihre physiologische Funktion der Angiogenese auch *in vivo* auszuführen und gefäßähnliche Strukturen in der Maus im Matrigel zu generieren.



immo. HUVEC

immo. HMVEC

Abbildung 31: Histologie der re-isolierten Matrigelplugs

Nach 14 Tagen wurden das Matrigel aus den Rag-2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen isoliert und histologisch analysiert. Dabei wurden die Schnitte für humanes CD31 (braun) gefärbt um die Endothelzellen humanen Ursprungs von denungefärbten murinen Endothelzellen unterscheiden zu können.

3.4.4 Globale Transkriptom-Expressionsanalyse

Es wurde eine globale Transkriptom-Expressionsanalyse durchgeführt, um möglichst umfassend, die in dieser Arbeit etablierten HUVEC-Zelllinien mit primären Zellen und anderen Zelltypen zu vergleichen. Die globale Transkriptomanalyse wurde ausgewählt, da diese Methode am besten geeignet ist, um verschiedene Fragestellungen zu beantworten, da diese Methode es erlaubt mit geringem Aufwand und reproduzierbar einen umfassenden Überblick über den Phänotyp der jeweiligen Zellen zu erhalten.

Tabelle 11: Für die globale Transkriptom-Expressionsanalyse verwendete Zellen:

Zellen	Passage	Tage in Kultur	cPDL
primäre HUVEC	8	24	9,6
HUVEC I38-2	18	75	40,9
HUVEC I38-4	18	75	40,9
HUVEC I38-5	18	75	40,9
HMVEC I46-12	18	78	34,9
Primäre Gingiva-Fibroblasten Spender P001	8	18	9,4
Primäre Gingiva-Fibroblasten Spender P005	10	25	11,2
Primäre Gingiva-Fibroblasten Spender HFB	6	15	6,8
Primäre Gingiva-Fibroblasten Spender HFB	22	98	18,6

Zum einen war es interessant herauszufinden, ob sich durch die Immortalisierung das Expressionsprofil der HUVEC-Linien so stark verändert hat, das anhand dessen, keine Zuordnung mehr zu dem Zelltyp der Endothelzellen gelingt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob nicht nur der Zelltyp sondern auch der Ursprung der Endothelzellen anhand des globalen Transkriptoms zugeordnet werden kann. Des Weiteren war interessant zu untersuchen, ob sich Anhand der Expressionsprofile Unterschiede zwischen den einzelnen HUVEC-Linien beobachten lassen. Da sich die einzelnen HUVEC-Zelllinien in ihren Genkombinationen und Integrationsmustern unterscheiden, war es außerdem von Interesse, zu analysieren, ob aufgrund dessen unterschiedliche Signalkaskaden in den Zellen aktiviert werden die Aufgrund des Expressionsprofils zu beobachten sind. Die durch den Array untersuchten Zellen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

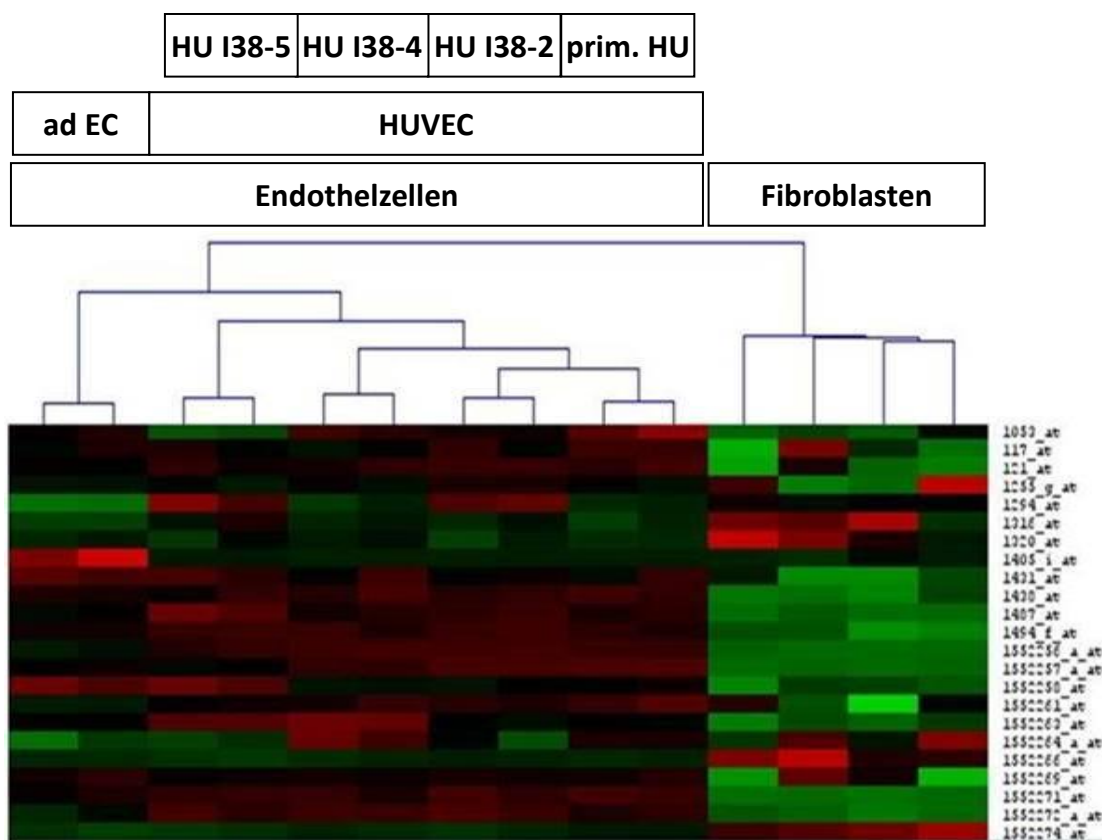


Abbildung 32: Ausschnitt der „Heat Map“ der globalen Transkriptom-Expressionsanalyse

Zur Transkriptom-Expressionsanalyse primärer HUVECs, den HUVEC-Zelllinien I38, der HMVEC Linie I46-12 und Gingiva Fibroblasten wurde ein DNA-Microarray (Affymetrix, HG-U133 Plus 2.0.) verwendet, der das komplette humane Genom repräsentiert. Die Analyse wurde anhand von Triplets der Gesamt-mRNA der entsprechenden Zelltypen vorgenommen und die Daten in Form einer Heat Map und Cluster dargestellt.

Zur Analyse wurde ein DNA-Microarray (Affymetrix, HG-U133 Plus 2.0.) verwendet, der das komplette humane Genom repräsentiert. Triplets der Gesamt-mRNA des entsprechenden Zelltyps wurden isoliert, in cDNA umgeschrieben und als fluoreszenz-markierte Sonde mit dem Chip hybridisiert (siehe 2.2.5, 2.2.5.1 und 2.4.5). Die Rohdaten wurden standardisiert und anschließend wurden die verschiedenen Proben geclustert (Abbildung 32).

Die Analyse ergab, dass trotz Immortalisierung der Zellursprung konserviert geblieben ist, da sowohl die primären Endothelzellen als auch die HUVEC und HMVEC Endothel-Zelllinien als Endothelzellen zusammen in einem Cluster liegen, klar abgegrenzt von den ebenfalls untersuchten primären Gingiva-Fibroblasten. Des Weiteren ist trotz Immortalisierung der spezielle Endothel-Zelltyp erhalten geblieben, da die HUVEC-Zellen zusammen in einem Cluster liegen und sich durch ihr Expressionsprofil von den adulten Endothelzellen abgrenzen. Bei dem Vergleich der HUVEC-Zelllinien mit den primären HUVECs, ist die Zelllinie I38-2 von ihrem globalen Expressionsprofil den primären HUVECs am ähnlichsten. Darauf folgen dann die HUVEC-Linie I38-4 und I38-5. Bei der Gegenüberstellung der Expressionsprofile der einzelnen HUVEC-Zelllinien konnten keine gravierenden Unterschiede in dem Expressionsmuster festgestellt werden. Im Gegenteil, die Expressionsprofile sind sich trotz der unterschiedlichen Integrationsmuster und enthaltenen Genkombinationen der einzelnen HUVEC-Linien sehr ähnlich (Abbildung 32).

3.4.5 Tumorigenität

Durch das Einbringen von Immortalisierungsgenen in das Genom primärer Zellen, kommt es zur Deregulation des fein regulierten Zellzyklus. Im besten Fall kann dadurch die hier gewünschte funktionale Immortalisierung erreicht werden, im schlechtesten Fall kann diese Deregulation ein so drastisches Ausmaß annehmen, dass es zu einer Transformation der primären Zellen kommen kann. Das bedeutet, dass die Zellen entarten und durch ihr Wachstum Tumore formatieren können, also tumorigen sind. Um den Effekt der integrierten Immortalisierungsgene auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden sie in Bezug auf ihre Tumorigenität *in vitro* und *in vivo* untersucht.

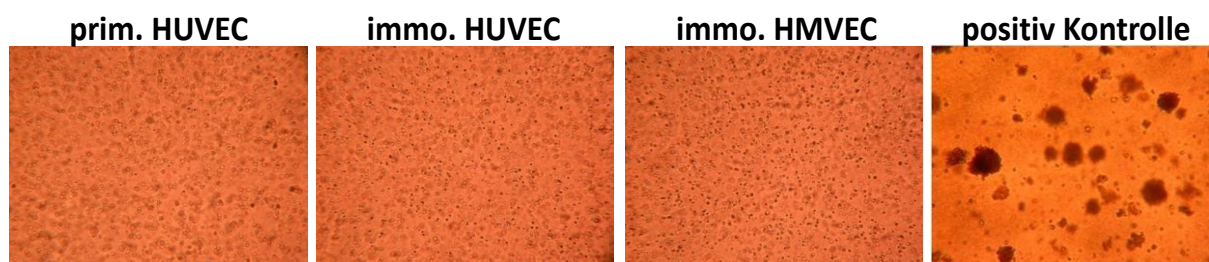


Abbildung 33: Softagar-Assay zur Evaluierung der Tumorigenität *in vitro*

Per Experiment werden 4×10^3 Zellen in 50 μ l 0,3% Overlay-Agar in Mikrotiter-Platten ausgesät, die vorher mit 50 μ l 0,6% Underlay-Agar beschichtet wurden. Die Zellen werden durch regelmäßige Zugabe von 50 μ l Medium pro Well für zwei bis drei Wochen kultiviert und die Kolonien gezählt. Die Positiv-Kontrolle sind Zellen der murinen Darmkarzinom-Zelllinie CT-26HA.

Die Fähigkeit zum Wachstum ohne die Verankerung auf einer Oberfläche ist ein Indikator für die Tumorigenität von Zellen und kann mit Hilfe des Softagar-Assays evaluiert werden (siehe Abbildung 33 und 2.4.4.1). Nicht-transformierte Zellen können nur unter Anheftung an eine feste Oberfläche und mit Hilfe von Wachstumsfaktoren proliferieren. Entartete Zellen hingegen sind in der Lage, ohne Anheftung und ohne bzw. mit geringeren Konzentrationen

an exogenen Wachstumsfaktoren zu proliferieren. Mit Hilfe dieses Versuchs kann evaluiert werden, ob vereinzelte Zellen die Fähigkeit besitzen im Soft-Agar zu proliferieren. Im Verlauf der Analyse wird beobachtet, ob die Zellen ohne Verankerung wachsen, Kolonien ausbilden können und somit entartet sind (Abbildung 33, positiv Kontrolle), oder aber als Einzelzellen in Suspension verbleiben und somit nicht tumorigen sind. Dabei ergab sich, dass sowohl die HUVEC- als auch die HMVEC-Linien wie die primären HUVECs *in vitro* nicht tumorigen sind und kein Wachstum und Koloniebildung während der vier Wochen zu beobachten war (Abbildung 33).

Um die Tumorigenität *in vivo* zu untersuchen, wurden die hier generierten Zelllinien als humane Xenotransplantate in immunodefiziente Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse eingebracht (siehe 2.4.4.2). Dabei wurden jeder Maus pro Seite je drei Millionen Zellen der entsprechenden immortalisierten Zelllinie subkutan injiziert. Bei stark tumorigenen humanen Zellen kommt es während dieses Versuchs bereits nach zwei bis vier Wochen zu einer Tumorformation in der Maus. Wie in Tabelle 12 abzulesen ist, kam es nach der Injektion der HUVEC-Linie I38-4 in keinem der sechs Experimente zu einer Tumorformation. Nach 150 Tagen zeigten die Mäuse immer noch kein Tumorwachstum. Nach der Injektion der HMVEC-Linie I46-12 hingegen kam es bereits nach 50 Tagen zu einer Tumorformation in 18 von 20 Fällen (Tabelle 12). In dem ersten Durchgang wurden 8 Experimente mit weiblichen als auch männlichen Mäusen durchgeführt, wobei in jedem Fall ein Tumor detektiert werden konnte. Daraufhin wurde ein zweiter Durchgang mit 12 Versuchen durchgeführt in dem nach 50 Tagen in zehn Fällen ein Tumorwachstum zu beobachten war und in zwei der Fälle nicht. Somit konnte für die HMVEC-Linie I46-12 eine eindeutige Tumorigenität *in vivo* nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Evaluierung der Tumorigenität *in vivo*

Zelltyp	Zellzahl/ subkutane Injektion	Tumor Formation	keine Tumor Formation	Dauer des Versuchs in Tagen
HUVEC	3 Mio	0	6	150
HMVEC	3 Mio	18	2	50

Die in dieser Arbeit generierten Zelllinien sind keine klonalen Linien, die nur aus einem einzigen Zellklon bestehen, sondern die Linien sind polyklonal und bestehen aus einem Pool von Zellklonen, in dem es wahrscheinlich in jeder Zelle zu einer Integration von einem unterschiedlichen Subset an Genen in das Genom gekommen ist. Um zu untersuchen, welche Genkombinationen in den, aus der polyklonalen HMVEC-Linie I46-12 resultierenden Tumore vertreten waren und somit vielleicht für die Tumorentstehung verantwortlich sind, wurden vier Tumore isoliert und das Integrationsmuster analysiert. Dabei wurden die Tumore auf alle ursprünglich durch Transduktion eingebrachten 33 Gene mittels PCR-

Analyse untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 13 dargestellt. In den Spalten 1-2 sind die Immortalisierungsgene aufgeführt. In den Spalten 3-6 sind die Ergebnisse der PCR-Analyse der vier HMVEC Tumore aufgeführt. Die Gene, die nach Infektion nicht mittels PCR nachgewiesen werden konnten sind rot markiert und die Gene die durch PCR detektiert werden konnten sind in grün markiert. Zum Vergleich wurde das Ergebnis der PCR-Analyse der Zelllinie I46-12 in Spalte 8 eingefügt, die ausschließlich *in vitro* kultiviert wurde.

Tabelle 13: PCR-Analyse der ex-vivo isolierten Tumore und der in vitro kultivierten HMVEC-Zelllinie I46-12

Nr.	Gene	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	Tumor 4		I46 Inf 12
1	Id2						
2	Fos						
3	NS1						
4	Jun						
5	E2F1						
6	βCat						
7	TAg						
8	Myb						
9	Id3						
10	E7						
11	E6						
12	Bcl2						
13	HoxA9						
14	Bmi1						
15	PymT						
16	Core						
17	Oct3						
18	Klf4						
19	Id1						
20	Myc						
21	Lmo2						
22	Nfe2L2						
23	Yap1						
24	Nanog						
25	Sox2						
26	RhoA						
27	Ezh2						
28	Gli1						
29	v-Myc						
30	Sez12						
31	ZFP217						
32	Id4						
33	Rex						

Durch die Analyse wurde deutlich, dass in jedem Tumor eine andere Genkombination vertreten war (Tabelle 13). Da die Tumore aus der polyklonalen Zelllinie HMVEC I46-12 resultieren, ist es wahrscheinlich, dass die Tumore aus nur einem oder wenigen Zellklonen dieser Linie entstanden sind, die durch das Wachstum in der Maus selektiert wurden.

Dadurch ergibt sich das unterschiedliche PCR-Profil der einzelnen Tumore. Dabei fallen prominente Vertreter auf, die in allen vier Tumoren detektiert werden konnten. Es handelt sich dabei um die Gene ID2, Fos, ID3, E7, ID1 und Nanog. Auch in der *in vitro* kultivierten Zelllinie sind diese Gene vertreten. Jedoch fällt auf, dass in manchen Tumoren Gene detektiert werden konnten, die in keinem anderen Tumor oder der *in vitro* kultivierten Zelllinie auftauchen, wie z.B. E6, Bmi1 und Rex. Was sich ebenfalls mit der Selektion auf einzelne Zellklone der polyklonalen Linie im Wachstum *in vivo* erklären lässt. *In vitro* machen diese Klone unter Umständen nur einen sehr geringen Teil des Zellpools aus und können daher durch die PCR-Analyse der *in vitro* kultivierten Linie nicht detektiert werden. *In Vivo* bilden sie dann jedoch den Großteil des Tumors, da diese Klone vermutlich *in vivo* einen Wachstumsvorteil besitzen, so dass der Prozentsatz dieser Klone so stark ansteigt, dass auch diese Genkombinationen detektiert werden können.

3.4.5.1 Karyotyp-Analyse

Der Immortalisierungsprozess, besonders mit Hilfe der klassischen Immortalisierungsmethoden geht oft mit chromosomalen Abberationen und einer drastischen Veränderung des Karyotyps einher. Zum Beispiel induziert TAG zwar eine robuste Immortalisierung und Proliferation von Zellen, jedoch führt es zu starken Veränderungen des Genoms der Zellen (Meisner et al. 1988, Zitzelsberger et al. 2001). Die Karyotyp-Analyse wurde daher durchgeführt, um mögliche chromosomale Abberationen zu untersuchen, die durch den Immortalisierungsvorgang der in dieser Arbeit etablierten Zelllinien entstanden sein könnten. Der Karyotyp bezeichnet in der Zytogenetik die Gesamtheit aller zytologisch erkennbaren Chromosomeneigenschaften eines Individuums. Während dieser Analyse werden Eigenschaften wie die die Anzahl der Chromosomen einer Zelle ebenso wie ihre Ausbildung, die relative und die absolute Größe, die Lage des Zentromers, Sekundäreinschnürungen, spezifische Bandenmuster sowie die Chromatinverteilung im Chromosom untersucht. Dazu werden die Chromosomen in der Metaphase der Mitose über Chromosomen-färbungen erkennbar gemacht und mikroskopisch untersucht. Anschließend werden sie paarweise zu einem Karyogramm angeordnet. Die mit Hilfe der Karyotyp-Analyse untersuchten Zellen sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zellen die in der Karyotypen-Analyse untersucht wurden

Zellen	Passage	Tage in Kultur	cPDL
primäre HUVEC	7	20	8
HUVEC I38-2	20	82	46,5
HUVEC I38-4	20	82	46,5
HUVEC I38-5	18	75	40,9

Der Karyotyp der primären HUVEC Zellen, sowie der HUVEC Zelllinien I38-2, I38-4 und I38-5 wurde untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die primären HUVECs diploid sind, jedoch

ein Ringchromosom in 25% der untersuchten Metaphasen (n = 16) gefunden wurde (46, XY, r(13)(p12q12)). Die aus diesen primären Zellen hervorgegangenen HUVEC-Zelllinien waren ebenfalls diploid und enthielten das besagte Ringchromosom. In Linie I38-5 wurde zusätzlich noch eine Translokation zwischen den Chromosomen 6 und 11 festgestellt (46, XY, t(6;11)(q27;q21),r(13)(p12q12)). Die beiden anderen immortalisierten HUVEC-Zelllinien wiesen einen, den primären HUVECs ähnlichen Karyotyp auf. Das bedeutet, dass die Insertion der Expansionsgene in das Genom der primären Zellen und deren Expression zu keiner weiteren Akquirierung von Mutationen geführt hat.

3.4.6 Stabilität der Expression von endothelspezifischen Markern und Funktionen in den HUVEC-Linien I38-2, I38-4 und I38-5

Die Stabilität der Expression zelltypspezifischer Marker und Funktionen ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal einer guten Zelllinie. Die Expression während der Kultivierung *in vitro* über einen langen Zeitraum soll nicht nachlassen oder gar verloren gehen, um eine verlässliche und vergleichbare Aussage von in den Zellen durchgeführten Untersuchungen zu garantieren. Besonders in Bezug auf den potentiellen Nutzen der hier etablierten Zelllinien im Wirkstoffscreening oder ADMETox-Tests ist eine gleichbleibende Qualität und Aussagekraft der erzielten Ergebnisse essentiell.

Tabelle 15: Zelllinien anhand derer die Stabilität der Expression endothelspezifischer Marker und Funktionen untersucht wurde

Zelltyp	Passage	Tage in Kultur	cPDL	CD31	CD309	TIE-1	TIE-2	TNF α Marker	acLDL	eNOS
HUVEC I38-2	11	47	17,8	X					X	X
HUVEC I38-2	20	82	46,5	X	X	X	X	X		
HUVEC I38-2	39	175	105,5	X	X	X	X	X	X	X
HUVEC I38-4	11	47	17,8	X					X	X
HUVEC I38-4	20	82	46,5	X					X	X
HUVEC I38-4	39	175	106,2	X					X	X
HUVEC I38-5	11	47	17,8	X					X	X
HUVEC I38-5	20	82	46,5	X						
HUVEC I38-5	39	175	111,5	X					X	X

Daher wurde die Stabilität der Expression von endothelspezifischen Markern und Funktionen in den HUVEC Zelllinien I38-2+4+5 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung analysiert (siehe Tabelle 15). Um die Stabilität, also den Erhalt der Expression zu beurteilen, wurde die Analyse der Marker während der Kultivierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt. In der ersten Spalte der Tabelle 15 sind alle hierfür untersuchten Zelllinien angegeben. In Spalte zwei bis vier ist der Zeitpunkt der Analyse abzulesen (Passage, Kultivierungsdauer und kumulative PDL). In den Spalten fünf bis elf sind die Experimente, die mit der entsprechenden Linie durchgeführt wurden und die Stabilität der Expression aufweisen mit einem Kreuzchen markiert.

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Stabilitätsanalyse der endothelspezifischen Oberflächenmarker der HUVEC-Zelllinie I38-2 dargestellt. Hierbei wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren CD31, CD309, TIE-1 und TIE-2 zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung der Linie I38-2 miteinander verglichen. Zum ersten Zeitpunkt der Analyse befand sich die Linie in Passage 20, war 82 Tage durchgehend in Kultur und hatte eine cPDL von 46,5 erreicht. Die Ergebnisse des ersten Zeitpunkts werden mit den Ergebnissen des zweiten Zeitpunkts verglichen, indem sich die Zellen in der Passage 39 befanden, 175 Tage in Kultur waren und eine cPDL von 105,5 erreicht hatten. Dabei ist zu beobachten, dass die Expression über die Zeit der Kultivierung konstant bleibt und die Fraktion der Hochexpressierer in dem Zellpool der Linie sogar etwas zunimmt. Bei der Expression des TIE-2-Rezeptors besteht der Zellpool zum ersten Zeitpunkt der Analyse aus einem Gemisch von Niedrig- und Hochexpressierern. Zum Zeitpunkt der zweiten Analyse, 93 Tage später, sind in dem Pool der Zelllinie nur noch die Hochexpressierer vertreten, die sich durch Selektion durchgesetzt haben.

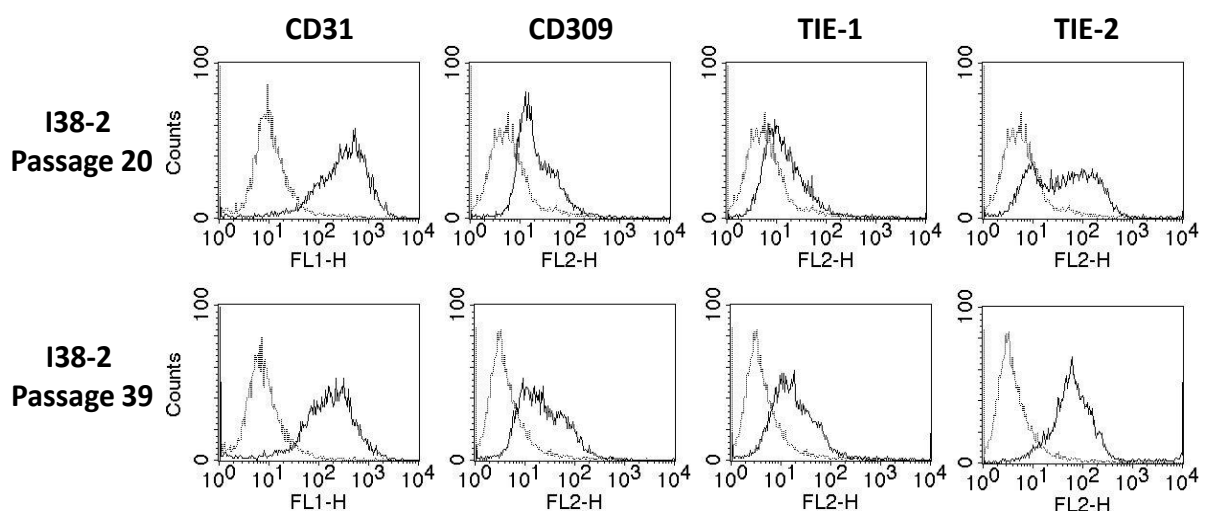


Abbildung 34: Stabilität der Oberflächenmarker-Expression der HUVEC-Linie I38-2

Die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie bei den Passagen 20 und 39 analysiert und das Ergebnis ist anhand der dunkelgrauen Linie dargestellt. Als Negativkontrolle dienen ungefärbte Zellen (hellgrau).

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Stabilitätsanalyse der Oberflächenmarker CD62, CD54 und CD106 von I38-2 dargestellt, deren Expression während einer Inflammation induziert wird. Für alle drei Oberflächenproteine bleibt die Expression während des Kultivierungszeitraumes von 175 Tagen nahezu identisch erhalten und ist daher stabil. Selbst die heterologe Marker-Expression der Population bleibt erhalten und stabil, es hat über diesen langen Zeitraum also keine Selektion auf Nichtexpremierer oder Hochexpremierer stattgefunden.

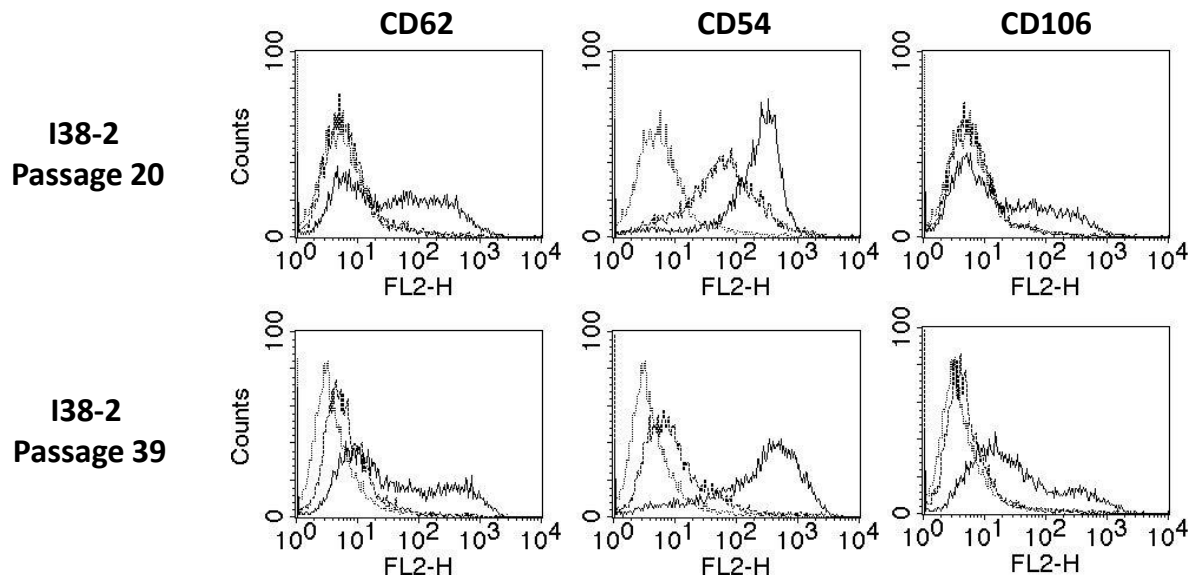


Abbildung 35: Stabilität der Expression der inflammationsabhängigen Oberflächenmarker der Linie HUVEC I38-2

Analyse der Expression der inflammationsabhängigen Oberflächenmarker Selektin CD62E, ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) auf der Oberfläche der Endothelzellen von Linie I38-2 mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu der Passage 20 und 39. Der jeweils erste Peak der Graphen stellt die Messung der ungefärbten, unstimulierten Zellen des entsprechenden Zelltyps dar, der jeweils zweite Peak zeigt die unstimulierten und gefärbten Zellen und der dritte Peak stellt die Expression von CD62E nach vier Stunden der Stimulation durch 25ng/ml TNF- α für den entsprechenden Zelltyp dar.

Zum Zeitpunkt der frühen Passage 20 weisen die Zellen bereits im unstimulierten Zustand eine mittlere Expression des Marker CD54 auf und befinden sich somit bereits ohne TNF α -Induktion in einem entzündeten Zustand (Abbildung 35). Interessant ist jedoch die Beobachtung, dass die CD54 Expression der uninduzierten Zellen zu der späteren Passage abnimmt. Normalerweise würde der gegenteilige Effekt erwartet, da Zelllinien durch lange Kultivierung in einen Seneszenz-ähnlichen Zustand übergehen und dieses zur Expression von Entzündungsmarkern führt. Die Zellen die hier jedoch bereits in der frühen Passage CD54 uninduziert exprimieren, sind vermutlich primäre Zellen des Zellpools die nicht immortalisiert werden konnten. Sie werden seneszent, exprimieren dadurch bereits unstimuliert CD54, sterben im Laufe der weiteren Kultivierung und werden somit aus dem Zellpool entfernt. Die immortalisierten Zellen des Zellpools konservieren den Phänotyp der primären Zellen zum frühen Zeitpunkt der Immortalisierung, indem die primären Zellen noch

nicht seneszent sind und sich nicht in einem Entzündungszustand befinden. Sie sind in der Population des Zellpools der frühen Passage nur gering vertreten, wachsen jedoch durch die Immortalisierung und das Sterben der seneszenten Zellen aus dem Zellpool durch und bilden zum Zeitpunkt der zweiten Analyse in der späten Passage den Großteil der Population.

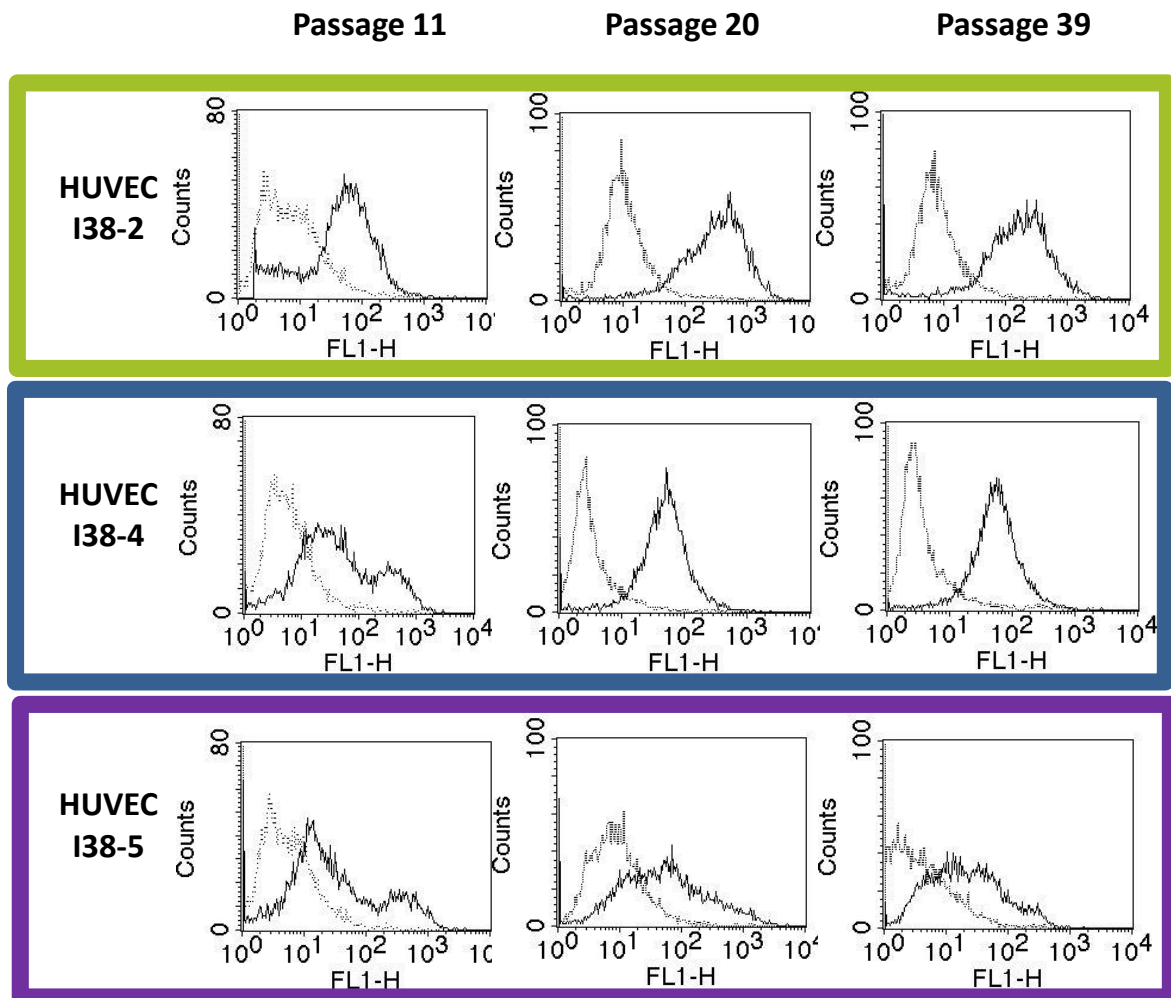


Abbildung 36: Vergleich der Stabilität der HUVEC I38-Zelllinien für die Expression von CD31

Dargestellt ist die FACS-Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD31 der jeweiligen Zelllinien HUVEC I38-2, I38-4 und I38-5 zu den Passagen 11, 20 und 39. Die hellgraue Linie zeigt die negativ Kontrolle des entsprechenden Zelltyps und die schwarze Linie die Intensität der Fluoreszenz der Zelle.

Bei der Analyse der Stabilität der Expression des Oberflächenmarkers CD31 wurden die Zelllinien I38-2+4+5 zu drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abbildung 36). Zum ersten Zeitpunkt befanden sich alle drei Linien in Passage 11, waren 47 Tage in Kultur und hatten eine cPDL von 17,8 erreicht. Zum zweiten Zeitpunkt waren sie in Passage 20, 82 Tage in Kultur und wiesen eine cPDL von 46,5 auf. Die letzte Analyse wurde nach 175 Tagen durchgeführt, bei der die Zellen in Passage 39 waren und eine cPDL von bis zu 111,5 erreicht

hatten. Der Pool der Zelllinie I38-2 weist zum Zeitpunkt der ersten Analyse zwei Populationen auf: Zellen die CD31 nicht exprimieren und Zellen, die CD31 exprimieren (Abbildung 36; grün umrandet). Im Verlauf der Kultivierung hat eine Selektion auf die Zellen stattgefunden die CD31 exprimieren, deren Expressionslevel im weiteren Verlauf der Kultivierung stabil bleibt bzw. sogar leicht zunimmt. In dem blauen Kasten der Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Linie I38-4 dargestellt. Der Pool dieser Linie ist in Passage 11 ebenfalls noch heterogen, aber bereits in Passage 20 hat sich die Population der Mittelexprimierer durchgesetzt, die eine stabile Expression aufweisen. Im Vergleich zu den Linien I38-2+4 ist die CD31 Expression der Linie I38-5 am geringsten, bleibt über den gesamten Zeitraum der Analyse sehr heterogen und nimmt nach 175 Tagen sogar ab (Abbildung 36; violett umrandet). Im Vergleich der drei Zelllinien untereinander für die Stabilität der CD31-Expression, sind zwar die beiden Linien I38-2 und I38-4 stabil, jedoch weist I38-2 die stärkste Expression auf.

Die Beobachtung, dass der Anteil an Hochexprimierern bei den beiden HUVEC Linien I38-2 und I38-4 im Verlauf der Kultivierung und mit steigender Passagenzahl zunimmt, ist verwunderlich, da normalerweise die Fähigkeit von Zelllinien, bestimmte Marker zu exprimieren im Verlauf der Kultivierung abnimmt oder gar gänzlich verschwindet. Die Hochexprimierer sind jedoch von Anfang an in der heterogenen Population der Linie zu einer geringen Passagenzahl vorhanden, jedoch zu einem geringen Prozentanteil. Der Großteil der heterogenen Population wird von Mittel- und Nichtexprimierern gebildet (siehe Passage 11; Abbildung 36). Bei den Mittel- und Nichtexprimierern handelt es sich vermutlich um nicht immortalisierte Zellen, die im Verlauf der Kultivierung seneszent werden, die Fähigkeit zur CD31 Expression verlieren und durch die Passagierung der Zellen aus dem Zellpool der Linie verschwinden (Abbildung 36). Bei den Hochexprimierern handelt es sich hingegen um immortalisierte Zellen, die zwar zu Anfang in der Zellpopulation nur gering vertreten sind, jedoch mit zunehmender Passagenzahl und Kultivierungsdauer in dem Pool durchwachsen, bis letztendlich der gesamte Zellpool der Linie nur noch aus immortalisierten Zellen besteht. Da die Immortalisierung den Phänotyp der Zellen zum Zeitpunkt der Immortalisierung konserviert und quasi „einfriert“, behalten die immortalisierten Zellen ihre Fähigkeit zur hohen Expression des Oberflächenmarkers auch noch nach langer Kultivierungsdauer und hoher Passagenzahl (siehe Passage 39; Abbildung 36). Im Vergleich zu den Linien I38-2 und I38-4 setzt sich bei der Linie I38-5 kein bestimmter Phänotyp in Bezug auf die CD31 Marker-Expression im Verlauf der Kultivierung durch, sondern die Population bleibt heterogen (Abbildung 36, lila umrandet).

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der drei Linien I38-2 (grün umrandet), I38-4 (blau umrandet) und I38-5 (violett umrandet) für die Stabilität der Aufnahme von acetyliertem LDL und die Aktivität der eNOS dargestellt.

Die Aufnahme von acLDL bleibt in allen drei Zelllinien über den Zeitraum der Kultivierung von 175 Tagen stabil und ist in der Intensität in allen drei Linien identisch. Jedoch ist zu

beobachten, dass sich zum Zeitpunkt der letzten Analyse in Passage 39 in allen drei Linien eine kleine Population von Zellen gebildet hat, die diese Funktion verloren hat.

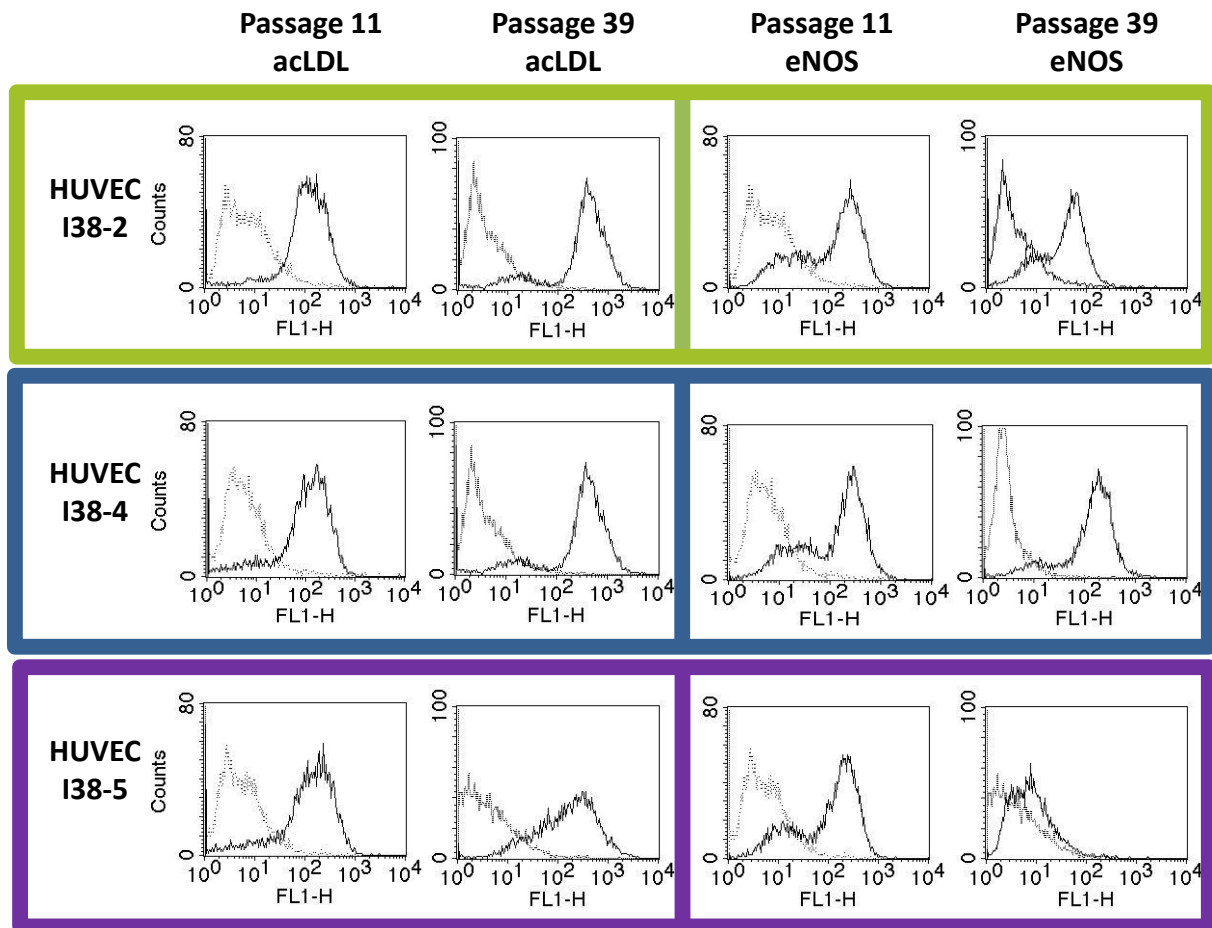


Abbildung 37: Stabilität der HUVEC I38 Zelllinien für die Aufnahme von acLDL und die Aktivität der eNOS

Dargestellt ist die FACS-Analyse der Aufnahme von acLDL (links) und der Aktivität der eNOS (rechts) der jeweiligen Zelllinien HUVEC I38-2, I38-4 und I38-5 zu den Passagen 11 und 39. Die hellgraue Linie zeigt die negativ Kontrolle des entsprechenden Zelltyps und die schwarze Linie die Intensität der Fluoreszenz der Zelle. Bei dem acLDL-Assay resultiert die Fluoreszenz aus der Aufnahme von FITC-konjugiertem acLDL für den entsprechenden Zelltyp. Bei dem eNOS-Assay wird das zellpermeablen DAF-2-DA durch die Anwesenheit von intrazellulärem NO in die fluoreszierende Form DAF-FM transformiert. Das intrazelluläre NO stammt dabei aus der Reaktion der aktiven eNOS mit L-Arginin. Somit ist der Nachweis von DAF-FM der indirekte Nachweis der Aktivität der eNOS.

Für die Untersuchung der Stabilität der Aktivität der eNOS sind die Ergebnisse der drei Linien I38-2, I38-4 und I38-5 in Abbildung 37 dargestellt. Der Vergleich der Ergebnisse der Analyse von I38-2 (grün umrandet) der Passagen 11 und 39 zeigt, dass die Aktivität leicht abnimmt. Die Linie I38-5 (violett umrandet) verliert die Aktivität der eNOS während dem Zeitraum der Kultivierung. In der Linie I38-4 (blau umrandet) bleibt die Aktivität der eNOS in allen Passagen (P11 und P39) und während dem kompletten Zeitraum von 175 Tagen stabil und ist im Vergleich zu den anderen beiden hier untersuchten Linien am stärksten.

3.4.6.1 Stabilität der CD31-Expression in Mittel- und Hochexpremierern der Zelllinie

HUVEC I38-5

Aufgrund der Beobachtung, während der Untersuchung der Stabilität der CD31 Expression von der HUVEC Linie I38-5 (siehe 3.4.6), dass sich kein bestimmter Phänotyp im Verlauf der Kultivierung durchsetzte, sondern die Population in Bezug auf die Marker-Expression heterogen blieb, war es als nächstes interessant zu untersuchen, was mit einzelnen, aus dieser heterogenen Population, isolierten Klonen geschieht. Es wurde eine Sortierung von Fraktionen des Zellpools der polyklonalen Linie durchgeführt und die daraus resultierenden Klone in Bezug auf die Expression des ursprünglich heterogen exprimierten Oberflächenmarkers CD31 untersucht.

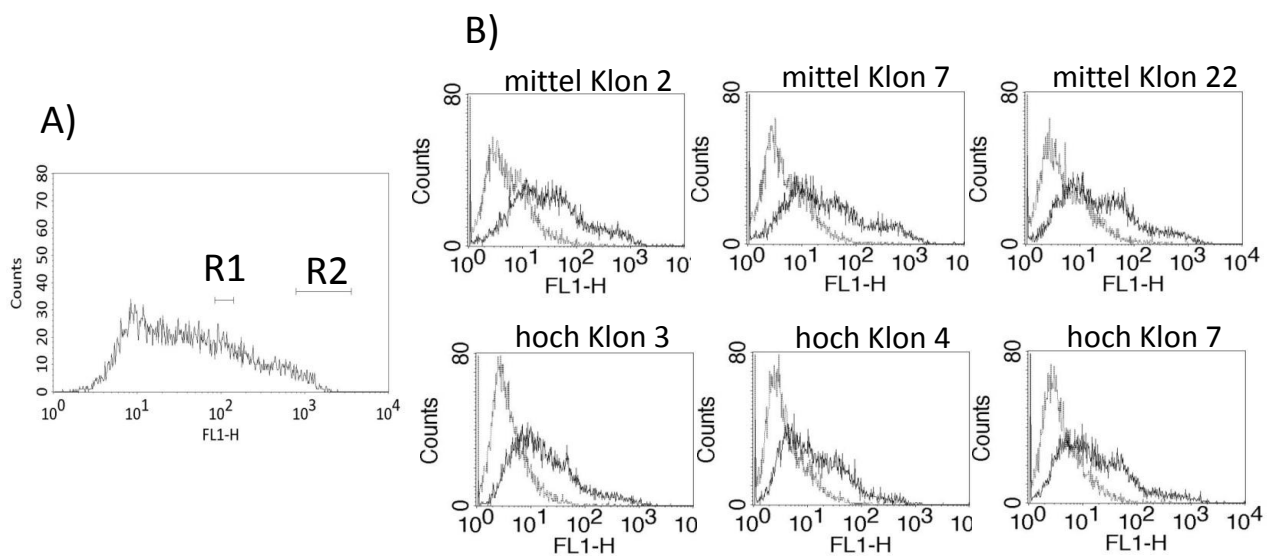


Abbildung 38: Sorting der polyklonalen HUVEC Linie I38-5

A): Sortierung der Mittel (R1)- und Hochexpremierer (R2) der CD31 Expression der Linie I38-5.
B): Analyse der CD31-Expression unterschiedlicher Klone der Mittel (obere Zeile)- und Hochexpremierer (untere Zeile) der Linie I38-5 36 Tage in Kultur nach Sortierung.

Die Zelllinie HUVEC I38-5 ist in ihrer Expression für den Marker CD31 heterogen, d.h. man kann in der Analyse dieses Markers in Abbildung 38-A eine Verteilung der Zellen über einen breiten Expressionsbereich erkennen (von 10¹ bis 10³) (siehe auch Abbildung 36). Somit besteht diese polyklonale Zelllinie aus einem Gemisch von Zellen, die diesen Marker niedrig, mittel, bzw. hoch exprimieren. Aus diesem Gemisch wurden Klone der Population der Mittelexpemierer (Abbildung 38-A; R1) für CD31 und der Hochexpemierer (Abbildung 38-A; R2) aussortiert. Die einzelnen Klone wurden für 36 Tage in Kultur genommen, um genügend Zellen einer klonalen Population für eine anschließende Untersuchung der Expression des Markers CD31 zu erlangen und die Entwicklung der Stabilität dieses Markers in den klonalen Kulturen untersuchen zu können. Nach einer erneuten Analyse der CD31 Expression (siehe

Abbildung 38-B) konnte beobachtet werden, dass die klonalen Kulturen der Mittelexprimierer (Abbildung 38-B; obere Zeile) sich erneut in Hoch- und Mittelexprimierer aufspalten und die klonalen Kulturen der Hochexprimierer ebenfalls (Abbildung 38-B; untere Zeile). Das bedeutet, dass die Klone in ihrer ursprünglichen Expressionsstärke des Markers nicht stabil bleiben, sondern eine Aufspaltung der klonalen Linien in Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke stattfindet

Grund dafür könnte die in Infektion I38-5 enthaltene Genkombination sein, die zu dem am drastischsten veränderten Karyotyp, im Vergleich zu den anderen HUVEC-Linien und den primären HUVECs führte (siehe 3.4.5.1). Dieser Umstand könnte zu einer erhöhten Mutationsrate dieser Zelllinie führen. Bedingt durch diese Mutationen könnten sekundäre Effekte dazu führen, dass sich kein homogener Phänotyp durchsetzen kann, da innerhalb kürzester Zeit, durch die hohe Mutationsrate, wieder eine Aufspaltung in viele unterschiedliche Phänotypen, mit unterschiedlichen Expressionseigenschaften in Bezug auf den Marker, erfolgt.

3.4.7 Reproduzierbarkeit der Immortalisierung und des Phänotyps

Es sollte untersucht werden, ob der Phänotyp der Zelllinien reproduzierbar mit den ermittelten Immortalisierungsprotokollen zu etablieren ist. Das heißt, ob unter der Verwendung der gleichen Genkombination erneut eine Immortalisierung erreicht werden kann und das gleiche Verhalten in Bezug auf die kumulative Populationsverdopplung und der Charakterisierung für die endothel-spezifischen Marker und Funktionen zu beobachten ist.

Tabelle 16: Durchgeführte Infektionen um die Reproduzierbarkeit zu untersuchen

	primäre HUVEC	2 Pool 1-4	4 Pool 1-4	5 Pool 1-4	nur cMyc	nur ID-1	nur ID-2	nur cFos	rtTA2	GFP
		c-Myc	c-Myc	c-Myc	cMyc				rtTA2	GFP
		ID-1	ID-1			ID-1				
		ID-2		ID-2			ID-2			
			c-Fos	c-Fos				cFos		
Zelllinie	nein	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
cPDL	9,6	86,5	86,5	86,5	41,9	37,6	31,6	37,6	31	27,7
Tage in Kultur	32	128	128	128	94	94	88	91	88	81

Dazu wurden für jede der drei HUVEC-Zelllinien (I38-2, I38-4 und I38-5) je vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die in der entsprechenden Linie detektierten Genkombinationen wurden in je vier neuen Infektionen von primären HUVEC Zellen verwendet, die im Folgenden als Pool 1-4 bezeichnet werden (Tabelle 16, Spalte 3-5). Anschließend wurden die Infektionen expandiert, um zu evaluieren, ob unter der Verwendung der gleichen Genkombination erneut eine Immortalisierung erreicht werden kann. Dabei konnten die in I38-2+4+5 gefundenen Genkombinationen verifiziert werden, d.h., unter der Verwendung der gleichen Genkombination konnten erneut immortalisierte HUVEC-Zelllinien mit einer robusten Proliferation etabliert werden (Abbildung 39; Tabelle 16, Spalte 3-5).

Um auszuschließen, dass Insertionsmutagenese für die Immortalisierung der HUVEC-Zellen verantwortlich ist, wurden primäre HUVECs mit Kontrollvektoren infiziert, die entweder für GFP (Grün fluoreszierendes Protein) oder ein irrelevantes Gen (reverser Transaktivator; rtTA2) in ihrer Expressionskassette kodieren. Jedoch konnte eine Insertionsmutagenese ausgeschlossen werden, da die Kontrollinfektionen bereits nach spätestens 88 Tagen starben. Die uninfizierten primären HUVECs starben bereits nach 32 Tagen in denen sie nur sehr geringes Wachstum zeigten (cPDL 9,6) (Abbildung 39; Tabelle 16).

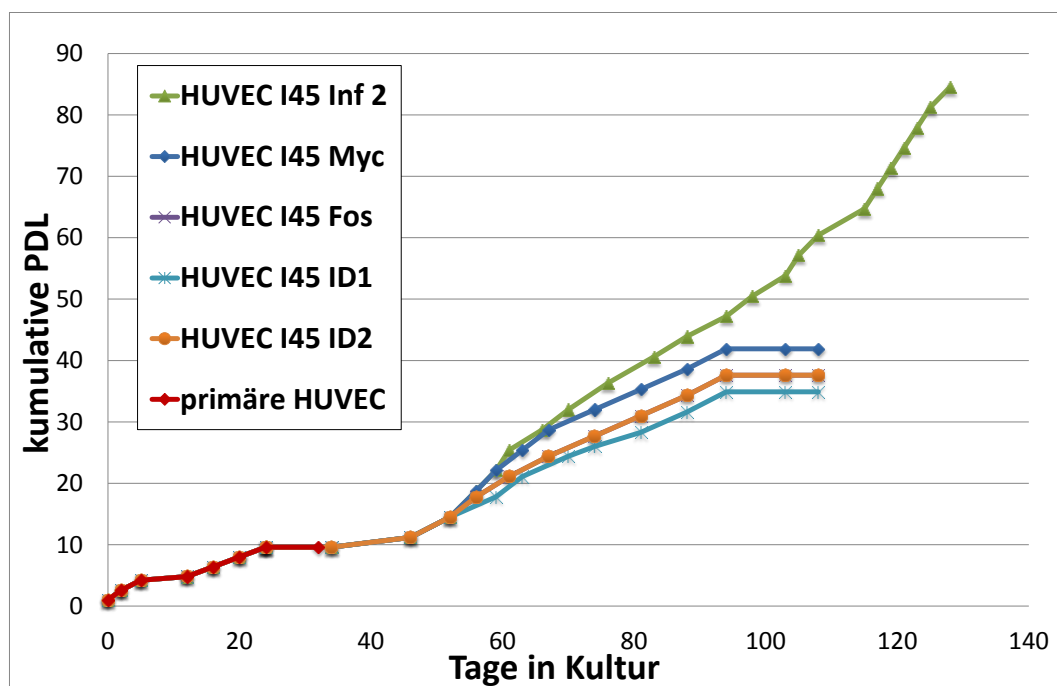


Abbildung 39: Kumulative Populationsverdopplungen der Infektionen von I45

Dargestellt sind beispielhaft die kumulativen Populationsverdopplungen über die Tage in Kultur der Verifizierungsinfektion I45-2 und der Einzelinfektionen zur Kontrolle. Zum Vergleich ist die kumulative Populationsverdopplung von primären HUVEC-Zellen in Rot dargestellt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob das Set der vier in den HUVEC-Linien detektierten Gene noch weiter reduziert werden kann bzw. die Gene alleine in der Lage sind

die Zellen zu immortalisieren, z.B. durch c-Myc. Um dies zu untersuchen wurden primäre HUVECs mit jeweils einem der vier Gene transduziert (Tabelle 16, Spalte 6-9). Jedoch ist keines der vier Gene alleine in der Lage primäre HUVECs zu immortalisieren und somit konnte auf diese Art und Weise keine HUVEC Zelllinie generiert werden (Abbildung 39; Tabelle 16; graues Kästchen mit einem X). Die Einzelinfektionen wiesen alle eine viel geringere kumulative Populationsverdopplung auf (maximal 41,9 cPDL) im Vergleich zu den Nachinfektionen I45-2, I45-4 und I45-5 (alle 86,5 cPDL). Zusätzlich starben die Einzelinfektionen bereits nach spätestens 94 Tagen, wohingegen die Expansion der Nachinfektionen nach 128 Tagen eingestellt wurde. Jedoch kann im Vergleich zu den primären Zellen bereits durch die Einzelinfektionen eine verlängerte Kultivierungsdauer erzielt werden (siehe Abbildung 39 und Tabelle 16), jedoch ist ihre Proliferationsstärke und PDL im Vergleich zu den Zelllinien signifikant reduziert.

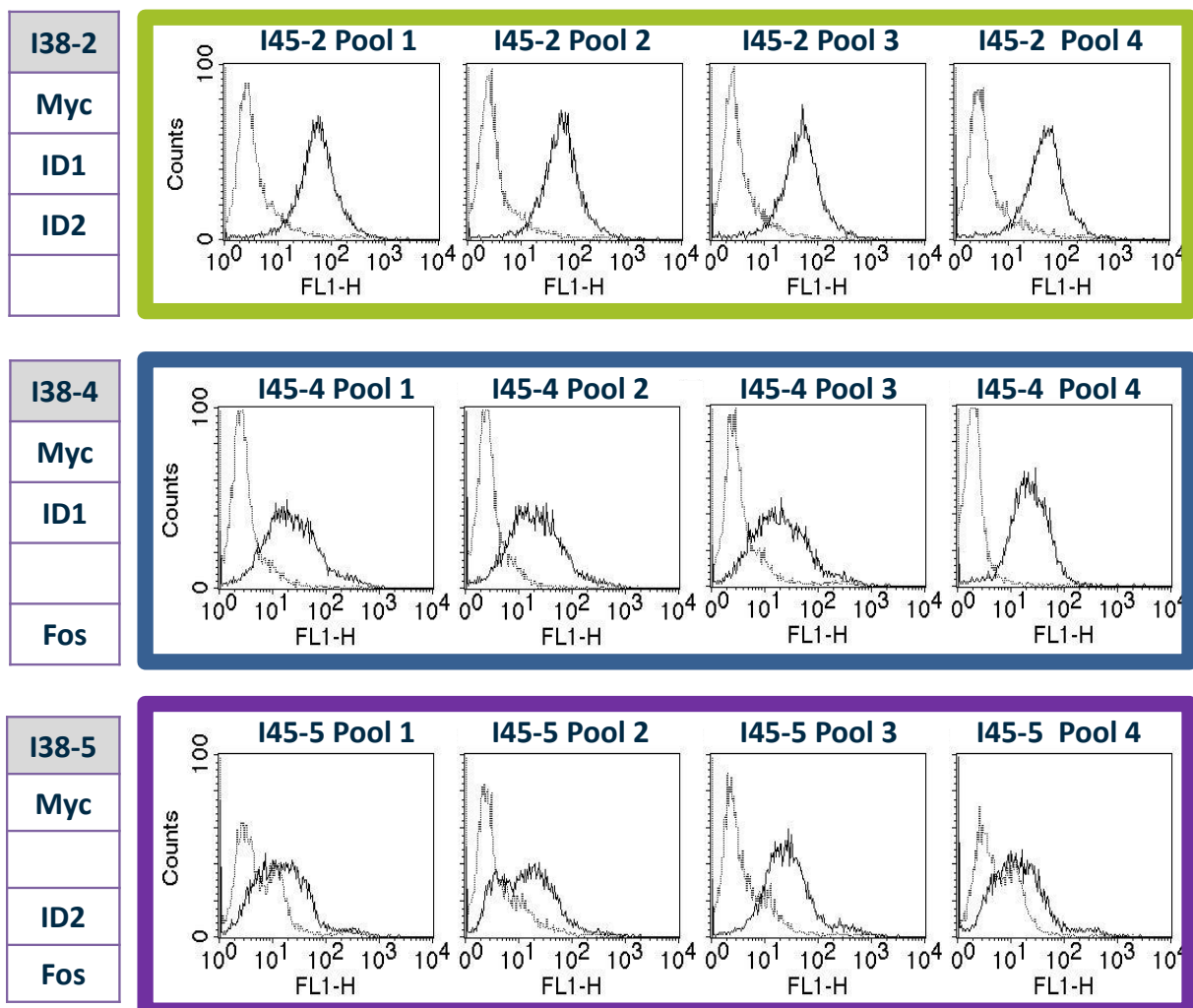


Abbildung 40: Expression des Oberflächenmarkers CD31

Dargestellt ist die FACS-Analyse der CD31 Expression der unterschiedlichen Zellpools 1-4 der jeweiligen Zelllinien HUVEC I45-2, I45-4 und I45-5. Die hellgraue Linie zeigt die negativ Kontrolle des entsprechenden Zelltyps und die schwarze Linie die Intensität der Fluoreszenz der Zelle.

Während der Kultivierung wurden die verschiedenen Pools der immortalisierten HUVEC-Zelllinien I45-2, I45-4 und I45-5 auf den endothelspezifischen Marker CD31 (Abbildung 40) und die Funktionen Aufnahme von acLDL (Abbildung 41) und Aktivität der eNOS (Abbildung 42) untersucht.

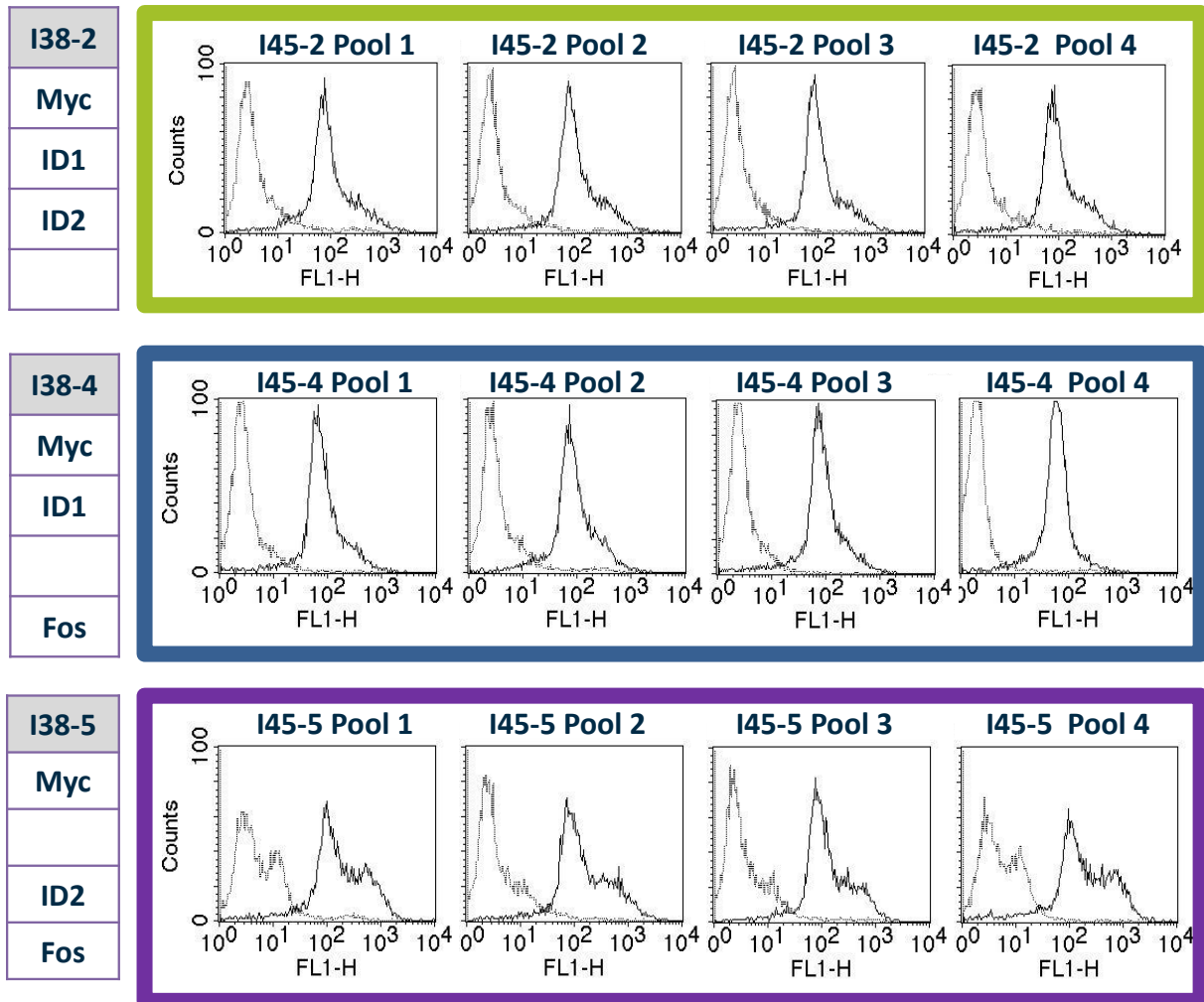


Abbildung 41: Aufnahme des acetylierten LDL

Dargestellt ist die FACS-Analyse der Aufnahme von acLDL unterschiedlichen Zellpools 1-4 der jeweiligen Zelllinien HUVEC I45-2, I45-4 und I45-5. Die hellgraue Linie zeigt die negativ Kontrolle des entsprechenden Zelltyps und die schwarze Linie die Intensität der Fluoreszenz der Zelle, resultierend aus der Aufnahme von FITC-konjugiertem acLDL für den entsprechenden Zelltyp.

Wie in den Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 42 zu erkennen ist, verhalten sich die unterschiedlichen Pools der Zelllinien auch in der Expressionsstärke der Marker und Funktionen nahezu identisch (I45-2 grün umrandet, I45-4 blau umrandet, I45-5 violett umrandet). Des Weiteren entspricht die Expressionsstärke der unterschiedlichen Marker der der ursprünglichen Infektionen I38-2, I38-4 und I38-5 (siehe zum Vergleich Abbildung 17, Abbildung 25 und Abbildung 26). Das bedeutet, dass unter Verwendung der gleichen Genkombination nicht nur eine Immortalisierung der primären Zellen erreicht werden kann,

sondern sogar der Phänotyp der ursprünglichen Zelllinie in all seinen Eigenschaften reproduziert werden kann. Abschließend lässt sich zu der Analyse der Reproduzierbarkeit sagen, dass wenn man die gleiche Genkombination zur Infektion von primären Zellen verwendet, man immer zu dem gleichen Ergebnis kommt, also immer zu dem ursprünglichen Phänotyp. Es wird in jedem Fall eine Immortalisierung erreicht und die daraus resultierende Zelllinie weist immer die gleiche Expressionsstärke für den entsprechenden Marker auf. Der Vergleich der neu etablierten Zellpools (I45) mit den ursprünglich etablierten Zelllinien (I38) zeigt, dass die Genkombination aus c-Myc, ID1 und ID2 zu einer Zelllinie führt die eine robuste Proliferation und die besten Eigenschaften in Bezug auf endothel-spezifische Marker und Funktionen aufweist.

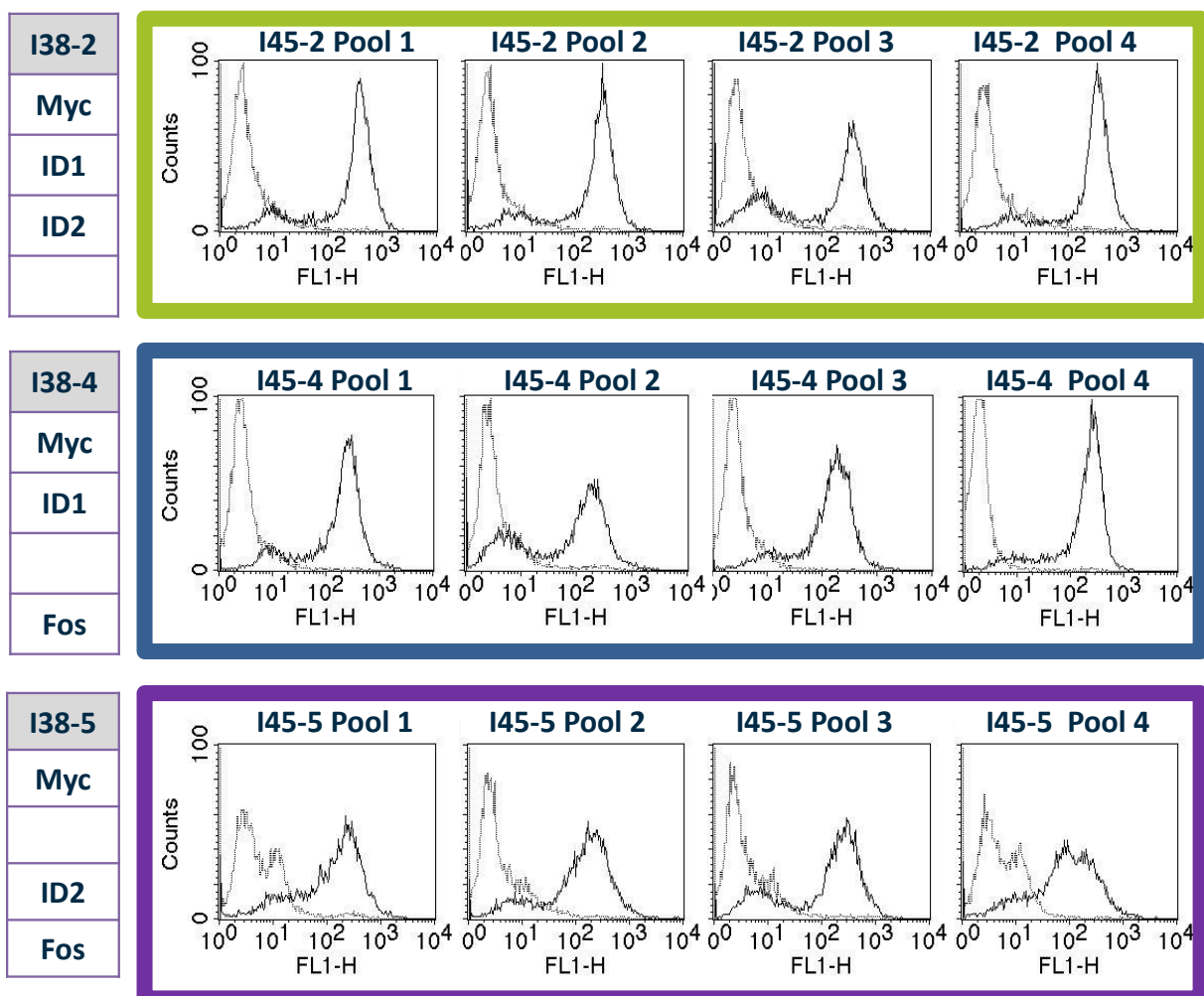


Abbildung 42: Aktivität der eNOS

Dargestellt ist die FACS-Analyse der Färbung des zellpermeablen DAF-2-DA, das durch die Anwesenheit von intrazellulärem NO in die fluoreszierende Form DAF-FM transformiert wird. Das intrazelluläre NO stammt dabei aus der Reaktion der aktiven eNOS mit L-Arginin. Somit ist der Nachweis von DAF-FM der indirekte Nachweis der Aktivität der eNOS. In der Abbildung sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Zellpools 1-4 der jeweiligen Zelllinien HUVEC I45-2, I45-4 und I45-5 dargestellt. Die hellgraue Linie zeigt die negativ Kontrolle des entsprechenden Zelltyps und die schwarze Linie die Intensität der Fluoreszenz der Zelle.

4 Diskussion

Die Perspektive der Zellliniengenerierung wurde mit den ersten Immortalisierungsstrategien eröffnet (siehe 1.4). Dabei werden neue Zelllinien mit starken Onkogenen generiert, wobei bisher lediglich eine begrenzte Anzahl von Onkogenen für die Immortalisierung verwendet wurde (Agarwal and Eckert 1990, Peterson et al. 1995, Haga et al. 2007, Zhang et al. 2007a, Lutterbach and Hann 1997, Gil et al. 2005). Diese Strategie funktioniert jedoch nur für einige wenige Zelltypen (Farwell et al. 2000) und die daraus generierten Zelllinien weisen meist einen unnatürlichen Phänotyp auf, so dass darin durchgeführte Untersuchungen nur wenig Aussagekraft in Bezug auf native Vorgänge in der Zelle haben (Kan et al. 2012, Laviolle et al. 1988).

Ziel dieser Arbeit war es neue funktionale Endothel-Zelllinien zu generieren. Mit dem hier verfolgten Ansatz sollten aus einer Bank von 33 Immortalisierungsgenen diejenigen herausgesiebt werden, die eine funktionale Immortalisierung ermöglichen und den physiologischen Phänotyp der primären Zellen erhalten. Dazu wurden die entsprechenden primären Zellen mit der kompletten hierfür etablierten Immortalisierungs-Genbank oder unterschiedlichen Genkombinationen daraus gleichzeitig transduziert. Anschließend wurden aus den auf diese Art generierten Zelllinien mit Hilfe der Untersuchung auf zelltypspezifische Marker und Funktionen diejenigen ausgewählt, die einen primär-ähnlichen Phänotyp aufwiesen. Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass neue physiologisch relevante HUVEC und HMVEC Zelllinien generiert werden konnten.

4.1 Effekte der in der essentiellen Kombination der HUVEC-Linien gefundenen

Gene

Bei dem Versuch neue funktionale HUVEC-Zelllinien zu generieren, gelang es die drei physiologisch relevanten Linien I38-2, I38-4 und I38-5 zu etablieren (siehe 3.3.1). In diesen Linien wurden die vier Gene c-Myc, ID1, ID2 und c-Fos detektiert, die in unterschiedlichen Kombinationen von je drei dieser Kandidaten in das Genom der primären Zellen integrierten (Tabelle 5). Da unter der Verwendung dieser Genkombinationen in mehreren unabhängigen Infektionen primärer HUVECs, immer wieder Zelllinien mit einem identischen Phänotyp entstehen und der spezifische Phänotyp reproduziert werden kann, ist dies ein Hinweis darauf, dass die in der Zelllinie detektierte Genkombination für den spezifischen Phänotyp der entsprechenden Linie verantwortlich ist (siehe 3.4.7.).

Daraus ergab sich die Frage, warum ausgerechnet mit der Kombination drei dieser Gene ein solch erfolgreicher funktionaler Phänotyp erreicht werden kann. Oder anders gesagt: Warum ermöglicht das Zusammenspiel der Gene c-Myc, ID1, ID2 und c-Fos eine funktionale Immortalisierung von primären HUVECs?

Zellwachstum und Zelldifferenzierung sind normalerweise gegensätzliche Mechanismen einer Zelle. Durch die Aufklärung der Interaktionen der Faktoren c-Myc (Proliferation), ID2 (Differenzierung) und pRB (Tumorsuppressor der Zellzyklus-Arrest induziert) wurde jedoch klar, dass die Zellzyklus-Regulierung oder das Zellschicksal ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von Faktoren ist, deren Funktion in einem neuen Zusammenhang gesehen werden muss.

Im Folgenden erstelle ich anhand der bisher bekannten Literatur eine Hypothese für das Netzwerk, dass die Immortalisierung von HUVECs ermöglicht. Das Beispiel HUVEC wurde gewählt, da mit den vier Genen eine überschaubare Anzahl an Faktoren identifiziert wurde.

Die HUVEC Linie I38-2 ist aufgrund ihres Verhaltens in der Charakterisierung für endothel-spezifische Marker und Funktionen im Vergleich zu primären HUVECs, die phänotypisch beste HUVEC-Zelllinie I38-2 (siehe 3.4.6, 3.4.7 und 3.4). In ihr wurden die Gene c-Myc, ID1 und ID2 detektiert. Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist für das Überleben von Zellen im Allgemeinen essentiell (Meyer and Penn 2008). Dabei ist seine Expression strikt reguliert. Keine Expression von c-Myc führt zum Tod der Zellen, eine physiologische c-Myc Expression ist essentiell für das Überleben und eine Überexpression durch Translokation oder Amplifikation des c-Myc Gens führt zu einer Entartung der Zellen. Es ist bekannt, dass die Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Myc zu einer Immortalisierung von Zellen dienen kann, da seine Überexpression Tumorwachstum induziert (Bartlett et al. 1988, Gil et al. 2005, Lutterbach and Hann 1997, Thibodeaux et al. 2009, Sugihara et al. 2012).

Die hier etablierten HUVEC-Zelllinien weisen jedoch trotz zusätzlicher Integration in das Genom und somit erhöhter Expression von c-Myc kein Tumorwachstum auf (siehe 3.4.5). Des Weiteren ist die alleinige Infektion von primären HUVECs mit c-Myc nicht ausreichend um eine Immortalisierung hervorzurufen (siehe 3.4.7). Somit liegt die Vermutung nahe, dass in den Linien I38-2+4+5 die Wirkung von c-Myc und somit die Aktivierung der Transkription der c-Myc Zielgene nur leicht erhöht ist, genug um zu einer Immortalisierung in Kombination mit den anderen Kandidaten beizutragen, aber doch nicht so viel, dass es zu einer Entartung der Zellen führt, sondern der physiologische Phänotyp erhalten bleibt.

Myc ist ein bHLH-Transkriptionsfaktor der Klasse III (zuerst postuliert von (Murre et al. 1989) und aktiviert die Transkription an den Promotoren der Myc Zielgene über das Binden an die entsprechenden Enhancer-Sequenzen (Fernandez et al. 2003, Nair and Burley 2003). Die ID-Proteine hingegen können selbst keine DNA binden (Norton 2000), sondern binden über die HLH-Domäne der ID-Proteine durch Heterodimerisierung an Transkriptionsfaktoren mit einem bHLH-Bindungsmotiv für die DNA (Lasorella et al. 2001, Sun et al. 1991, O'Toole et al. 2003) und verhindern dadurch die Bindung des Transkriptionsfaktors an seine DNA-Zielsequenz. Das Binden der ID-Proteine an das bHLH-Motiv der Transkriptionsfaktoren passiert dabei in einer dominant-negativen Art und Weise (Benezra et al. 1990, O'Toole et al. 2003), das bedeutet, dass durch die Bindung von ID an den Transkriptionsfaktor dessen Wirkung inaktiviert wird. 1991 zeigten Sun et al. zum ersten Mal, dass Myc als bHLH-Protein

der Klasse III nicht von den ID-Proteinen ID1 und ID2 mit ihrer HLH-Domäne gebunden werden kann und somit von diesen ID-Proteinen nicht in seiner Aktivität und Wirkung inhibiert werden kann (Sun et al. 1991, Murre et al. 1994).

Darüber hinaus zeigten Goodrich et al. 1992 zum ersten Mal eine Interaktion zwischen c-Myc und dem Retinoblastom Tumorsuppressorprotein (pRB; siehe 1.2.3.2), indem sie eine Koinjektion der beiden Proteine in Zellen durchführten und feststellten, dass c-Myc den durch pRB induzierten Zellzyklus-Block in der G1-Phase aufhebt (Goodrich and Lee 1992). Sie zeigten somit, dass c-Myc der pRB-Aktivität entgegenwirkt und die Zellen ungehindert in die S-Phase eintreten können, sie konnten jedoch den Mechanismus der Interaktion nicht aufklären. Die Funktion des Tumorsuppressors pRB ist ein Block des Zellzyklus in der G1-Phase, damit Reparaturmechanismen durchgeführt werden können und die anschließende Regulation des Eintritts in die S-Phase (siehe 1.2.3.2) (Levine et al. 1991). Dabei wurde die unabhängige Regulierung der beiden Tumorsuppressoren pRB und p53 durch das Aufklären der Myc-pRB Interaktion deutlich, da nur pRB in seiner Aktivität von Myc inhibiert wird jedoch nicht p53 (Goodrich and Lee 1992).

1996 konnten Lasorella et al. die Interaktion von ID2 und pRB zeigen, da sie beobachteten, dass durch das Binden von ID2 an pRB, der durch pRB induzierte Zellzyklusarrest aufgehoben wird und die Zellen proliferieren und in ihrer Differenzierung gehemmt sind (Lasorella, Iavarone and Israel 1996, Iavarone et al. 1994). Dieser inhibierenden Effekt auf pRB konnte jedoch nur durch die Bindung von ID2 erzielt werden und nicht durch die Bindung von ID1 oder ID3. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass eine ID2 Überexpression einen p16 induzierten Zellzyklusarrest komplett aufhebt und zu einer geringeren Expression von Cyclin-D1 führt. Sie postulierten dabei folgenden Mechanismus (siehe Abbildung 43 und 1.2.3.4): p16 verhindert normalerweise die Bindung von Cyclin-D1 an CDK-4 oder CDK-6, somit können keine Cyclin-D1/CDK-4/6-Komplexe gebildet werden. Diese Komplexe sind dafür zuständig, pRB zu phosphorylieren und somit in eine inaktive Form zu versetzen. Kommt es jedoch zu einer ID-2 Überexpression, bindet ID2 an pRB und hebt die Wirkung von p16 auf. Die Cyclin-D1/CDK-4/6-Komplexe werden gebildet und pRB wird phosphoryliert. Im phosphorylierten inaktiven Zustand gibt pRB den Transkriptionsfaktor E2F frei, der wiederum den Eintritt in die S-Phase ermöglicht und die Transkription von Genen reguliert, die essentiell für die Zellproliferation sind. Dadurch wurde in Zellen mit einer hohen Konzentration von ID2 der Effekt einer starken Proliferation beobachtet (Zebedee and Hara 2001, Lasorella et al. 1996)

Im Oktober 2000 beschrieben Lasorella et al. zum ersten Mal das Zusammenspiel und die Interaktion der drei Faktoren Myc, ID2 und pRB (Lasorella et al. 2000). Dabei zeigten sie, dass während des normalen Zellzyklus nur wenig ID2 in den Zellkernen vorhanden und die wenigen vorhandenen Proteine durch die Bindung an hypophosphoryliertes pRB in ihrer Wirkung inhibiert sind, wodurch die Differenzierung und Proliferation der Zellen kontrolliert wird. Eine Amplifikation des c-Myc Gens kann jedoch durch das direkte Binden von c-Myc an die E-Boxen und zusätzlich an den dazugehörigen ID2-Promotor die Transkription von ID2

aktivieren und das native ID2-Level um das 20-30-fache erhöhen. Die Aktivierung der ID2-Transkription kann dabei durch die hohe ID2 Konzentration auch nicht gestoppt werden, da Myc einer der wenigen Transkriptionsfaktoren ist (TF Klasse III), die nicht durch das Binden von ID2 in ihrer Wirkung inhibiert werden können (Murre et al. 1994). Durch diese Myc-induzierte ID2-Überexpression werden sämtliche vorhandene hypophosphorylierte pRB Proteine von ID2 gebunden und somit eine Bindung von E2F an pRB verhindert. Somit kann kein Zellzyklusarrest über pRB mehr induziert werden und das freie E2F kann den Eintritt in die S-Phase sicherstellen und die Transkription von Proliferationsgenen induzieren (Gumireddy et al. 2003, Lasorella et al. 2000).

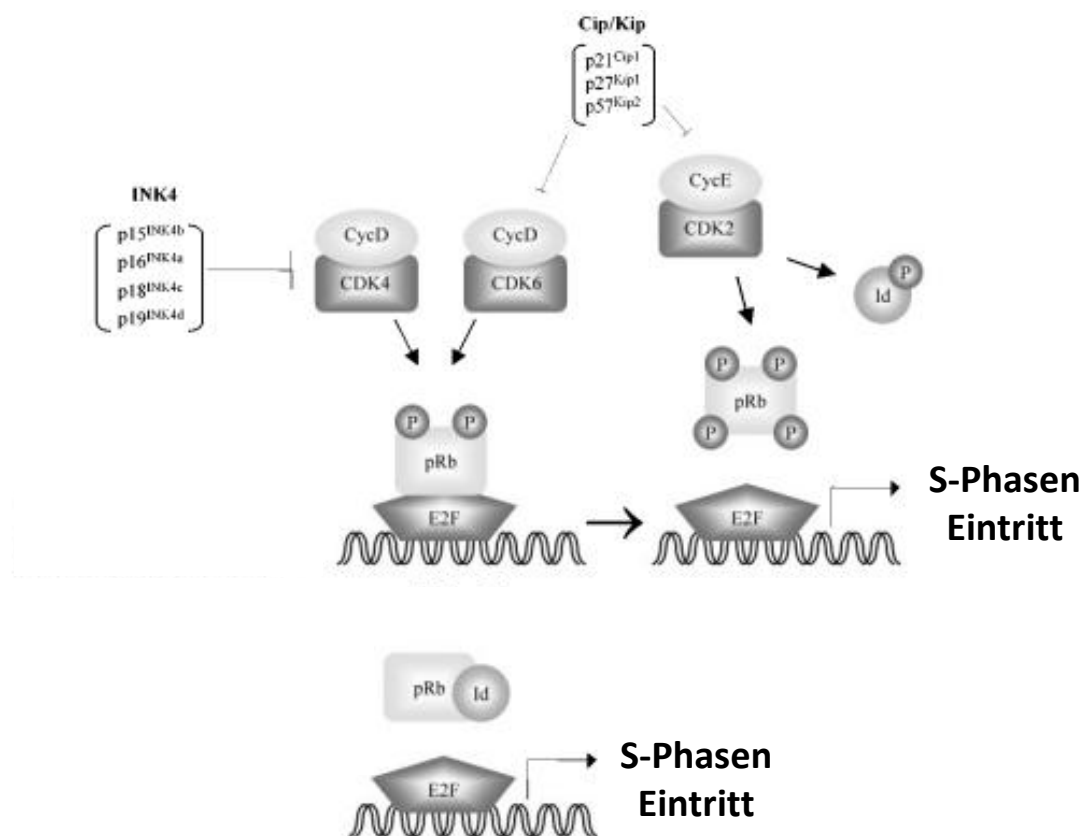


Abbildung 43: Regulation der G1-S-Phasen Transition durch ID-2 und pRB

Wenn ID-2 an pRB bindet, wird die inhibierende Wirkung von p16 auf die Zykline und CDKs aufgehoben. Diese können nun Zyklin-CDK-Komplexe bilden und pRB phosphorylieren. Dadurch wird pRB inaktiviert, E2F wird freigegeben und die Transition in die S-Phase findet statt. Abbildung verändert nach (Zebedee and Hara 2001).

Fan et al. fügten diesem Netzwerk von Myc-ID2-pRB 2012 noch einen weiteren Aspekt hinzu, indem sie zeigten, dass die Überexpression von ID2 noch durch einen weiteren Gesichtspunkt zusätzlichen zu den bisher genannten zu der Proliferation von Zellen beiträgt (Fan et al. 2012). Sie zeigten, dass die Transkription weiterer Tumorsuppressoren wie z.B. p21 durch ID2-Überexpression reduziert wird, die zu einem Zellzyklusarrest über den p53-Pathway führen könnte. Die Transkription dieser Tumorsuppressoren wird durch bHLH-Transkriptionsfaktoren der ersten und zweiten Klasse aktiviert. Ist im Zellkern jedoch eine hohe Konzentration von ID2 vorhanden werden diese Transkriptionsfaktoren von ID2

gebunden, ihre Bindung an die DNA verhindert und die Aktivierung der Transkription dieser Faktoren inhibiert. Somit können die Tumorsuppressoren p53 und p21 nicht exprimiert werden und das Zusammenspiel von Myc und ID2 sorgt so auf vielen Ebenen der Zellzykluskontrolle für den sicheren Eintritt in die S-Phase und somit für eine robuste Proliferation der Zellen.

Der dritte wichtige Faktor der in den funktionalen HUVEC-Zelllinien I38-4 und I38-5 zu einem physiologischen Phänotyp beiträgt ist c-Fos (siehe 1.3.4). Die Wirkung von c-Fos auf den Zellzyklus ist vielfältig und reicht von Proliferation, Apoptose bis zu der Transformation von Zellen (Shaulian and Karin 2001, Shaulian and Karin 2002). Dabei ist das exakte Resultat abhängig von umgebenden Faktoren und ist dabei hoch Gewebe- und Entwicklungsstadiumspezifisch. Induziert durch Serum oder Wachstumsfaktoren reguliert Fos die Expression von Zielgenen die zu der Proliferation von Zellen führen. Der proliferative Effekt der Fos Überexpression wurde zum Beispiel in Hepatocyten (Guller et al. 2008) und Osteoblasten (Sunter et al. 2004) gezeigt. Im Falle der Hepatozyten wurden immortalisierte humane Hepatozyten stabil mit c-Fos transfiziert um den Effekt einer c-Fos Überexpression zu untersuchen. Dabei wurde die Zellproliferation, die Level an Zellzyklusproteinen, wie z.B. den Zyklinen D1, E, und A, den CDKs CDK2, CDK4, und CDK6 und ihrer Inhibitoren p15, p16, p21, und p27 analysiert. Sie konnten dabei zeigen, dass eine c-Fos Überexpression zur Proliferation von Hepatozyten durch die Stabilisierung von Cyklin D1 führt (Guller et al. 2008). Im Falle der Osteoblasten wurden Osteoblasten-Zelllinien generiert, die c-Fos unter der Kontrolle eines Tet-Promotors exprimieren, um den Effekt von c-Fos auf den Zellzyklus zu untersuchen. Die c-Fos Überexpression führte dabei zu einem beschleunigten Eintritt in die S-Phase, resultierend aus der Deregulierung der Zyklin-A/E-CDK2-Aktivität und eine dadurch bedingte Proliferation der Osteoblasten (Sunter et al. 2004). Des Weiteren beschrieben Kalra et al. (Kalra and Kumar 2004) die Interaktion von c-Fos und c-Myc, indem sie beobachteten, dass sich der c-Fos Promotor unter der Kontrolle von c-Myc befindet.

Meine Hypothese zu dem Zusammenspiel der Faktoren in den HUVEC Zelllinien lautet:

Eine ektopische Genexpression der Faktoren Myc, Fos und ID1 oder ID2 ist notwendig um eine funktionale Immortalisierung von primären HUVECs zu erreichen. Myc kontrolliert die Expression sowohl von ID2 als auch von c-Fos. Durch das Einbringen der Gene in das Genom von primären Zellen kommt es zu einer Überexpression. Sowohl für ID-Proteine als auch für c-Fos wurde bereits beschrieben, dass eine ektopische Überexpression des Gens die Proliferation von Zellen induziert (siehe den vorangegangenen Abschnitt; (Barone et al. 1994, Iavarone et al. 1994, Sunter et al. 2004)). Dabei scheint sich interessanterweise die Expression der einzelnen Faktoren in einem bestimmten Expressionsfenster einzupegeln, wodurch erzielt wird, dass zwar die entsprechenden Zellzykluskontrollmechanismen außer Kraft gesetzt werden, aber andererseits keine völlige Deregulation der Proliferation stattfindet und die Zellen tumorigen werden. Daher liegt in den Zelllinien vermutlich eine moderate Myc Expression vor, wohingegen sowohl die ID-Proteine als auch c-Fos stärker überexprimiert werden. Diese Hypothese, dass die Expressionslevel der Faktoren

entscheidend für den Ausgang bzw. für den Phänotyp der etablierten Zelllinie sind, sollen in weiterführenden Arbeiten näher untersucht werden. Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass durch das Zusammenspiel dieser Faktoren eine funktionale Immortalisierung der primären HUVEC Zellen erreicht werden konnte.

Trotz der Aufklärung ihrer Rolle, ihrer Wirkung und des Einflusses dieser Faktoren auf den Zellzyklus und die Proliferation der Zellen in normalen Zellen und in der Karzinogenese, wurde die Kombination dieser Faktoren meines Wissens noch nie gezielt zur Immortalisierung und Zellliniengenerierung verwendet. Die Faktoren ID2 und c- Fos wurden in dem Zusammenhang der Immortalisierung noch nicht einmal einzeln diskutiert, geschweige denn in Kombination.

4.2 Reproduzierbarkeit ohne phänotypisch detektierbaren Positionseffekt

Bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Zellimmortalisierung mit Hilfe der identifizierten Genkombinationen (siehe Abschnitt 3.4.7), war die Beobachtung bemerkenswert, dass in vier unabhängigen Experimenten pro HUVEC-Zelllinie das gleiche Ergebnis erzielt werden konnte. Die aus den je vier Experimenten resultierenden Zelllinien verhielten sich während der Charakterisierung für endothel-spezifische Marker und Funktionen sehr ähnlich und wiesen einen annähernd identischen Phänotyp auf. Dies ist daher bemerkenswert, da mittels lentiviraler Infektion die Gene zufällig in das Genom integrieren.

Ganz zufällig ist die Integration mittels Lentiviren im Genom jedoch nicht, denn Lentiviren integrieren bevorzugt in Genloci mit aktiven Genen und Transkriptionshotspots (Schroder et al. 2002, Scherдин et al. 1990, Bushman 2003), vermutlich um ihre effiziente Expression sicherzustellen. Über den genauen Mechanismus der Auswahl des Integrationsortes wird im Moment noch spekuliert. Ein Grund könnte sein, dass aktive Genregionen dem Virus durch die offene Chromatinstruktur leicht zugänglich sind, oder aber Transkriptionsfaktoren an den Orten aktiver Transkription als Signal zur Integration dienen. Der Integrationsort beeinflusst maßgeblich die Expressionshöhe und das Expressionsmuster der integrierten Genexpressionskassetten. Diesen Effekt, dass die Expressionseigenschaft entscheidend von der chromosomalen Umgebung beeinflusst wird, nennt man Positionseffekt (Kleinjan and van Heyningen 1998).

Des Weiteren kommt es durch die Infektionsbedingungen zu großen Variationen der Integrationshäufigkeit der Gene in das Genom. Aufgrund der zufälligen Integrationshäufigkeit und Positionseffekte sollten die HUVEC-Linien dadurch Unterschiede in Bezug auf die Expressionshöhe der Marker und ihres Phänotyps aufweisen. Jedoch konnten anhand des Phänotyps keine Unterschiede festgestellt werden.

Meine Hypothese dazu lautet: Bei jedem Experiment werden ca. eine Million primärer Zellen mit der Genkombination, die in der entsprechenden HUVEC-Linie gefunden wurde, infiziert.

Die Expression der Gene Myc, ID1, ID2 und c-Fos wird dabei durch c-Myc über die Bindung an seine Enhancer-Boxen kontrolliert. Der Myc-Enhancer aktiviert die Transkription des SV-40 Promotors der Expressionskassette (Kumano et al. 1992). Da c-Myc die Transkription von 20% des humanen Genoms kontrolliert (Meyer and Penn 2008), gibt es enorm viele Enhancer-Boxen in dem Genom der primären Zellen, an die Myc binden kann (Farnham 2009). Wenn es nun durch Infektion zu einer zufälligen Integration der Expressionskassette in Orte aktiver Transkription im Genom der primären Zellen kommt, gibt es eine statistisch hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Gene, selbst nach zufälliger Integration, in den Einzugsbereich einer Myc Enhancer-Box integrieren und dadurch von Myc in ihrer Expression kontrolliert, zumindest aber beeinflusst werden (Farnham 2009). Zusätzlich bindet Myc den SV40-Promotor der Expressionskassette direkt und aktiviert die Transkription der Transgene. Die direkte Bindung des Promotors der Expressionskassette ist natürlich zuträglich, jedoch ist der Effekt der Transkriptions-aktivierung über einen Enhancer in Bezug auf die Quantität des produzierten Proteins enorm (Farnham 2009).

Aus dem ursprünglich infizierten Zell-Pool wachsen nur einige wenige immortalisierte Klone durch, die dann einen neuen Zellpool bilden. Dieser resultierende Zellpool besteht aus Zellen, in denen sich die Expression der Gene in einem bestimmten Bereich – wie oben beschrieben - befindet. Die Zellen, die eine zu geringe Expression der Immortalisierungsgene aufweisen sterben, weil sie nicht immortalisiert sind. Die Zellen, die eine zu hohe Expression der Immortalisierungsgene aufweisen sterben aufgrund des Stresses der Überexpression, da zum Beispiel eine extreme Überexpression von c-Fos Apoptose induziert (Hu et al. 1996). Diejenigen Zellen, die ein intermediäres Expressionslevel der Immortalisierungsgene aufweisen, überleben und setzen sich in der Population des Zellpools nach einiger Zeit durch Wachstum durch. Da bei jeder Neuinfektion pro Ansatz circa eine Million Zellen infiziert werden, ist die Wahrscheinlichkeit groß genug, dass in jedem unabhängigen Experiment Zellen generiert werden, die diesen intermediären Bereich der Expression erzielen und sich durch Selektion im Wachstum durchsetzen.

4.3 Zelltypspezifische Kombination der Immortalisierungsgene

Eine weitere interessante Feststellung war, dass die Genkombination, die zu einer erfolgreichen physiologischen Immortalisierung in primären HUVEC-Zellen gereichte, nicht für andere Zelltypen funktionierte. Bei der Infektion von primären HMVEC oder PBEC mit den Genkombinationen der drei erfolgreichen HUVEC Linien, konnte keine Immortalisierung der primären Zellen erreicht werden, geschweige denn eine physiologische Zelllinie. Die in den HUVEC-Linien gefundenen Genkombinationen sind somit nicht universell für jeden Zelltyp einsetzbar. Somit muss bei dem Versuch, einen neuen Zelltyp zu immortalisieren jedes Mal aufs Neue nach der individuellen optimal funktionierenden Genkombination aus allen 33 Genen der Genbank gescreent werden.

In klassischen Immortalisierungsansätzen (siehe auch 1.4 und 1.3.1) wird oft schon durch die alleinige Verwendung von sehr starken Onkogenen, wie z.B. TAg (Ahuja et al. 2005) oder E6 und E7 bereits eine Immortalisierung erreicht. Die alleinige Verwendung dieser Onkogene führt meist zu einer Entartung der Zelle, so dass die damit behandelten Zellen dadurch zwar immortalisiert werden können, jedoch eine dramatische Veränderung ihres nativen Phänotyps durchmachen und transformiert werden. TAg allein induziert Tumorstadium z.B. in Gehirnepithel (Chen and Van Dyke 1991) oder Prostataepithel (Masumori et al. 2001). E6 immortalisiert humane Prostatazellen (Maitland et al. 2004) und E7 funktioniert für humane Epithelzellen (Halbert, Demers and Galloway 1991). Andere Onkogene wie hTert funktionieren zwar manchmal auch als einziger Faktor für die Immortalisierung von bestimmten humanen primären Zellen, wie zum Beispiel humane Fibroblasten (Bodnar et al. 1998). Meist aber ist die alleinige Verwendung von hTert nicht ausreichend, um eine Immortalisierung von humanen Zellen zu erzielen. Daher wird es meist in Kombination mit einem weiteren Faktor, wie z.B. Myc für bovine Keimbahnzellen (Bi et al. 2007) oder TAg in humanen Leberendothelzellen (Matsumura et al. 2004) verwendet. Dabei sind die meisten Onkogene in ihrer immortalisierenden Wirkung entweder spezifisch für eine Spezies, einen Zelltyp oder beides. Während TAg zum Beispiel sehr effizient Nagerzellen immortalisiert, ist es alleine meist nicht ausreichend für die Immortalisierung humaner Zellen (Lee, Asa and Drucker 1992). Ein prominentes Beispiel für eine Zelltyp-spezifische Immortalisierungen ist das humane HoxB4 Gen. Es dient der Expansion von Hematopoetischen Zellen der Maus und des Hundes, funktioniert jedoch nicht für humane Zellen (Zhang et al. 2007b).

4.4 Tumorigenität der HMVEC Linie I46-12

Bei der Untersuchung der Tumorigenität *in vivo* wurde festgestellt, dass die HMVEC-Linie I46-12, im Gegensatz zu der HUVEC Linie, in 18 von 20 Experimenten tumorigen *in vivo* war. Dieses lässt sich vermutlich auf die im Genom der HMVEC-Linie integrierten Immortalisierungsgene zurückführen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Die in HMVEC I46-12 durch PCR detektierten im Genom integrierten Immortalisierungsgene

HMVEC I46-12	TAg	E7	HoxA9	Nanog	Sox2	Gli1	Ezh2	ID1	ID2	ID3	Fos	Myc
-----------------	-----	----	-------	-------	------	------	------	-----	-----	-----	-----	-----

Bemerkenswert ist, dass die Linie I46-12 *in vitro* kultiviert, zwar über ein Subset an Genen verfügt, das auch in den Tumoren detektiert werden kann, jedoch im Gegensatz zu den Tumoren als einziges TAg integriert hat. Da TAg als ein sehr starkes Onkogen gilt (Vass-Marengo et al. 1986, Ahuja et al. 2005), da es beide Tumorsuppressoren p53 (Rohaly et al. 2010) und pRB (De Luca et al. 1997, Wolf et al. 1995, Stubdal et al. 1997) inaktiviert, ist es erstaunlich, dass ausgerechnet dieses Gen in den Tumoren nicht auftaucht. Vermutlich übernimmt das in allen Tumoren vertretene und ebenfalls starke Onkogen E7 die Funktion (Strauss and Griffin 1990). E7 inaktiviert pRB, aktiviert die zelluläre Telomerase und kann in

alleiniger Verwendung schon die Transformation von Zellen induzieren (Giarre et al. 2001, Dick and Dyson 2002, Zhang et al. 2006a, Zwerschke and Jansen-Durr 2000). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass für die Immortalisierung und Tumorigenität der Zellen die Inaktivierung dieses einen Tumorsuppressors ausreichend ist und die Inaktivierung von p53 oder gar beider Signalwege (pRB und p53) nicht notwendig ist. Eine andere mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass andere Gene, die in den Tumoren detektiert wurden p53 inaktivieren, wie zum Beispiel die ID Proteine oder Bmi1.

Aufgrund dessen wurde die Anzahl der Gene in der zweiten Infektionsrunde der HMVEC I8 reduziert (siehe 3.3.2.2). Jedoch führte die Reduzierung der Gene im Falle der HMVEC-Linien nicht zu einer Optimierung des Phänotyps während der Charakterisierung in Bezug auf endothelspezifische Marker und Funktionen, sondern eher zu einer Verschlechterung. Ob die Reduzierung der Gene jedoch zu der Aufhebung der Tumorigenität führt, wurde aufgrund des nicht relevanten funktionalen Verhaltens der Linien nicht weiter untersucht.

4.5 Porzine Blut-Hirn-Schranken Endothel-Zellen

Ein gutes Modell der humanen BBB ist in vielen Disziplinen von enormem Interesse, z.B. um Mechanismen der Überwindung der BBB durch Pathogene zu studieren oder aber in der Wirkstoffentwicklung, die Fähigkeit der Substanzen zur Passage der BBB zu untersuchen (Cecchelli et al. 2007). Eine physiologische humane BBB erreicht *in vivo* einen Widerstand von ca. 2000 Ω , der sich durch die dichten Zell-Zell Kontakte, resultierend aus den spezifischen Tight-Junctions ergibt (siehe 3.4.3.3) (Abbott et al. 2010, Agarwal et al. 2010, Bernas et al. 2010). Da es für die humane BBB natürlich nicht die Option gibt, auf primäres Zellmaterial für diese Untersuchungen zurückzugreifen, behilft man sich durch die Verwendung von primärem Material aus anderen Säugern, wie z.B. dem Schwein, dem Rind oder der Ratte (Jeliazkova-Mecheva and Bobilya 2003, Zhang et al. 2006b, Sobue et al. 1999, Zenker et al. 2003). Diese primären Zellen sind jedoch nicht in der Lage auch nur annähernd den Wert von 2000 Ω Widerstand zu erreichen, zudem sterben sie bereits nach einigen wenigen Tagen in Kultur. Daher versucht man die Barriereeigenschaft dieser Zellen *in vitro* durch Manipulation künstlich zu erhöhen, z.B. durch Kultivierung mit Glukokortikoiden oder in Kokultur mit Astrozyten und Perizyten, um sich dem Wert der humanen BBB anzunähern (Nakagawa et al. 2009, Hartmann et al. 2009, Kroll et al. 2009).

Da die porcine Bluthirnschranke in Bezug auf die Expression der Tight-Junction Proteine im Vergleich zu Ratte oder Rind, der humanen BBB am ähnlichsten ist, sollte in dieser Arbeit versucht werden, eine BBB-Zelllinie aus primären PBEC Zellen zu generieren, um das Problem der schnellen Sterblichkeit des primären Materials in Kultur zu beheben. Anschließend sollte durch Manipulation während der Kultivierung versucht werden den TEER-Wert zu erhöhen.

Die Immortalisierung des PBEC-Zelltyps ist durch die Etablierung der zwei PBEC Linien 9 und 10 geglückt. Diese Linien weisen eine robusteste Proliferation im Vergleich zu den primären PBEC-Zellen auf, die bereits nach wenigen Tagen in Kultur sterben (siehe 3.3.3).

In vitro konnte für primäre porcine Bluthirnschrankenendothelzellen ein Widerstand von ca. 60 Ω gemessen werden (Erben et al. 1995). Dies ist ein ähnlicher Wert, wie er für die in dieser Arbeit generierten PBEC Linien 9 und 10 detektiert werden konnte. Galla *et al.* konnten jedoch eine Optimierung des gemessenen TEER-Wertes von primären PBECs durch die Behandlung der Zellen mit Glukokortikoiden, wie z.B. Hydrokortison, Dexamethason und Prednisolon auf einen Widerstand von ca. 1000 Ω erzielen (Kroll et al. 2009, Tenenbaum et al. 2008, Schrot et al. 2005, Weidenfeller et al. 2005). Diese Optimierung wurde mit den Beiden Linien 9 und 10 ebenfalls versucht, jedoch konnte dieser Effekt mit den in dieser Arbeit immortalisierten PBECs nicht reproduziert werden. Trotz Behandlung der Zellen mit diesen Glukokortikoiden in den unterschiedlichsten Konzentrationen, erreichten sie nur den TEER-Wert von unbehandelten primären PBECs *in vitro*.

Diese zu geringe Barriere-Eigenschaft in Bezug auf die Verwendung als Annäherung der humanen BBB ist jedoch für therapeutische Zwecke von geringem Nutzen. Um den Widerstand durch diese spezifischen und sehr komplexen Tight-Junctions zu generieren ist das Zusammenspiel von mehreren Zelltypen essentiell. Die Endothelzellen benötigen um eine physiologische BBB auszubilden den Kontakt mit Pericyten und Astrocyten (Zhang et al. 2011, Lee et al. 2003, Thanabalasundaram et al. 2011) und die, durch diese Kokultur geformte extrazelluläre Matrix (Hartmann et al. 2007). Dass die hier generierten PBEC-Linien nicht in Kokultur mit diesen Zelltypen kultiviert wurden, könnte ein Grund sein, warum sie nicht in der Lage sind einen, der BBB relevanten Widerstand auszubilden.

4.6 Anwendungsgebiete der etablierten Zelllinien

Neue Arzneien zu entwickeln ist ein aufwändiger, teurer und langwieriger Prozess. Im Schnitt vergehen 12 Jahre bis ein neuer Wirkstoff dem Patienten zur Verfügung steht. Dabei erhält von 10.000 untersuchten Substanzen im Durchschnitt nur eine einzige die Zulassung als Therapeutikum. Wegen nicht ausreichender Wirksamkeit oder inakzeptabler Nebenwirkungen der Präparate, werden viele Projekte häufig erst nach jahrelanger Entwicklung abgebrochen. So liegen die Entwicklungskosten für ein Arzneimittel in etwa bei 500 bis 800 Millionen Euro. Die zunehmende Anzahl, an in klinischen Tests gescheiterten Wirkstoffen und die zunehmenden Kosten in der Wirkstoffentwicklung, bestärken den Wunsch und Nutzen von aussagekräftigeren Zellkultur-Modellen. Die physiologische Relevanz von Zellen, die in zellbasierten Untersuchungen der Wirkstoffentdeckung, deren Entwicklung und Toxizität-Tests Verwendung finden, ist dabei der essentielle Faktor um die Aussagekraft solcher Analysen zu optimieren und eine bessere Vorhersage der Wirksamkeit zu gestatten. Es gibt daher die Bestrebung durch die Verwendung von physiologisch relevanten Zellen

bzw. physiologisch relevanten Testsystemen, das Risiko des Versagens von Wirkstoffen in kostenintensiven späten Phasen der klinischen Tests zu minimieren.

Die Industrie benötigt demnach aussagekräftige, reproduzierbare und stabile Zellmodelle. Durch den Nachweis der Stabilität der Expression von endothel-spezifischen Markern und Funktionen (siehe 3.4.6) und der Reproduzierbarkeit des physiologischen Phänotyps (siehe 3.4.7), eignen sich die in dieser Arbeit etablierten Zelllinien hervorragend für industrielle Applikationen. Diese aussagekräftigen Zellkultur-Modelle dieser Endothelzellen können zum Beispiel in Hochdurchsatz-„Screenings“ eingesetzt werden, um potentielle Wirkstoffkandidaten zu identifizieren oder aber auch in Verträglichkeitsuntersuchungen, mit Hilfe derer die Sicherheit neuer Substanzen evaluiert wird.

Des Weiteren können die Linien zur Aufklärung von endothel-assoziierten Krankheitsverläufen verwendet werden und so der Identifizierung von neuen Zielmolekülen für zukünftige Wirkstoffe dienen. Ein großes Anwendungsgebiet der in dieser Arbeit etablierten Endothel-Zelllinien sind zum Beispiel die Identifizierung von neuen Wirkstoffen für kardiovaskuläre Krankheiten oder für Tumorerkrankungen.

Kardiovaskuläre Krankheiten sind die Haupttodesursache in der westlichen Welt, daher sind neue Therapeutika, die mit Hilfe der in dieser Arbeit generierten Zelllinien gefunden werden könnten, zur Behandlung von zum Beispiel Arteriosklerose oder Herzinfarkten, von hohem Interesse. Neue Therapieansätze zur Behandlung von z.B. Bluthochdruck, zu dessen Behandlung Medikamente zur Vasodilatation gegeben werden, unter anderem NO-Donatoren, und zu dessen Ursache man unter anderem eine deregulierte eNOS vermutet, sollten durch die physiologische Aktivität der eNOS (siehe 3.4.3.2) in diesen Linien optimal getestet werden können.

In Bezug auf die Onkologie besitzen heutzutage Anti-Angiogenese Wirkstoffe (siehe auch 3.4.2.2 und 3.4.3.4) (Shojaei 2012) eine große Bedeutung. Neuartige Wirkstoffe, die eine verbesserte anti-Angiogenesewirkung besitzen, könnten ebenfalls durch die Verwendung dieser Zelllinien ideal gesucht und ihre Wirksamkeit getestet werden kann. Wirkstoffe wie der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab, besser bekannt als Avastin (Ferrara, Hillan and Novotny 2005, Blagosklonny 2005) findet bereits breite Verwendung in der Krebstherapie als Anti-Angiogenese Wirkstoff. Tumore müssen ab einer bestimmten Größe ihre Vaskularisierung sicherstellen, um mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden und weiter wachsen zu können. Dazu schütten sie VEGF aus, das an die VEGF-Rezeptoren benachbarter Endothelzellen bindet. Die Endothelzellen werden dadurch zu Wachstum stimuliert und migrieren chemotaktisch unter Bildung neuer Gefäße auf den Tumor zu, um ihn zu vaskularisieren und an das Blutssystem anzuschließen. Avastin ist ein Antikörper der das vom Tumor ausgeschüttete VEGF bindet und somit die Rekrutierung der Endothelzellen und die Vaskularisierung des Tumors unterbindet. Aufgrund der durch Avastin bedingten Nebenwirkungen und der sich schnell entwickelnden Resistenzen des Tumors in Bezug auf die Anti-Angiogenese-Chemotherapie (Mailliez et al. 2010, Shojaei 2012, Bocci and Loupakis

2012, Rahman et al. 2010, Jain et al. 2009, Yao and Phan 2011), ist die Entwicklung neuer Angiogenesehemmer mit besserer Verträglichkeit und längerer Wirksamkeit Gegenstand aktueller Forschung, deren Wirksamkeit in Endothelzellen getestet werden muss.

Des Weiteren wird Avastin „off-label“, d.h. in einer Indikation, in der es noch nicht zugelassen ist, zur Therapie der altersbedingten feuchten Makuladegeneration verwendet (Pitlick et al. 2012, Lynch and Cheng 2007). Bei dieser Erkrankung wachsen Gefäße in das retinale Pigmentepithel des Auges ein, die sich flächig unter der Netzhaut verbreiten, zu Blutungen durch platzen neigen und sehr schnell zum Verlust der Sehkraft führen (Melnikova 2005). Durch die intravitreale Verabreichung von Bevacizumab, also durch Injektion des Antikörpers in den Glaskörper, wird die Neovaskularisierung des Auges verhindert.

Die in dieser Arbeit etablierten Endothelzelllinien könnten des Weiteren in der Entwicklung von neuen Medikamenten zur Behandlung der erektilen Dysfunktion von hohem wirtschaftlichem Interesse sein, bei der Endothelzellen eine essentielle Rolle spielen. Medikamente wie Sildenafil (Viagra)(Ghofrani, Osterloh and Grimminger 2006), Vardenafil und Tadalafil (Cialis) sind Phosphodiesterase-5-Hemmer und inhibieren die Phosphodiesterase-5 (PDE-5) (Salonia, Rigatti and Montorsi 2003, Briganti et al. 2005a). Das Enzym PDE-5 baut selektiv den Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ab. Die eNOS in den Endothelzellen katalysiert die Oxidation der Aminosäure L-Arginin mit Hilfe von NADPH zu den Produkten NO und L-Citrullin. NO diffundiert daraufhin aus der Endothelzelle in die benachbarten, das Gefäß umgebenden glatten Muskelzellen (SMC = Smooth Muscle Cells). Dort aktiviert NO das Enzym lösliche Guanylatzyklase (GC), welches die Bildung des Botenstoffes cGMP katalysiert. cGMP führt dann zu der Relaxation der SMCs und Vasodilatation der Gefäße. Das Enzym PDE-5 inhibiert cGMP, wodurch die SMCs kontrahieren und sich die Gefäße verengen. Durch PDE-5-Hemmer wird PDE-5 in seiner Aktivität blockiert, cGMP nicht inhibiert und die dadurch erzielte Vasodilatation der Gefäße führt zum Einstrom von Blut in die Schwellkörper des Penis und letztendlich zu seiner Erektion (Briganti et al. 2005b). Somit könnte das Screening und die Evaluierung der Wirksamkeit neuer Medikamente, zur Therapie von erektiler Dysfunktion, in Zellmodellen einer Kokultur aus den in dieser Arbeit etablierten Endothelzelllinien und SMCs durchgeführt werden, oder aber die Qualitätskontrolle bereits vorhandener Therapeutika in solchen Modellen vorgenommen werden.

4.6.1 3D-Modelle

Da die konventionelle 2D-Kultur nicht in der Lage ist, die native Gewebemorphologie und die Zellkomposition komplexer Gewebe und Organe zu reflektieren, geht der Trend zu *in vitro* 3D-Technologien. Um noch aussagekräftigere Untersuchungen zu ermöglichen ist aktuell die Etablierung von physiologischen 3D-Zellkultur-Modellen sowohl in der Grundlagen- und der pharmazeutischen Forschung als auch in der Evaluierung von Chemikalien und Kosmetika

von hohem Interesse (Barrila et al. 2010, Zeitlin, Dong and Nor 2012). Im Moment ist die Unterversorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff der limitierende Faktor in der Komplexität dieser 3D-Gewebe und Organe (Griffith and Swartz 2006, Wenger et al. 2004). Daher ist bei der Generierung von Modellen in klinisch relevanter Größe eine Versorgung durch ein stabiles vaskuläres Netzwerk unabdingbar. Die Verwendung der in dieser Arbeit etablierten Zelllinien zur Vaskularisierung der 3D-Modelle könnten dieses Manko beheben und den Durchbruch zu weit komplexeren und größeren 3D-Modellen bedeuten, besonders in Bezug auf die Entwicklung von Kompletten *in vitro* synthetisierten Organen und Geweben (Suuronen et al. 2005), wie zum Beispiel der Leber (Sivaraman et al. 2005) oder Knochen (Papadimitropoulos et al. 2011). Die natürliche Eigenschaft von Endothelzellen sich selbst zu funktionsfähigen *de novo* Gefäßen zu assemblieren ist dabei ein enormer Vorteil.

4.6.2 Vergleich verschiedener Ansätze zu Generierung physiologisch relevanter Zellen

Zell-basierte Therapien, wobei neue Zellen in ein Gewebe transplantiert werden um eine physiologische Funktion wiederherzustellen oder zu etablieren (Schmidt et al. 2004, Griffith and Naughton 2002), haben viele bereits existierende und potentielle Applikationen (El Ghalbzouri et al. 2009). Das vielversprechende Feld der regenerativen Medizin hat bereits einige Produkte an den Markt gebracht, in Bezug auf die Reparatur von Haut, Knorpel und Knochen (Monfort et al. 2012, Borden et al. 2003, Hollander et al. 2006). Trotz dieser Fortschritte und Weiterentwicklungen bleibt das Problem der Versorgung und Gewinnung von Zellmaterial um solche Ansätze durchzuführen, was den Erfolg von Zell-basierten Therapien erschwert und schmälert. Um dieses Problem zu beheben wurden schon viele Anstrengungen unternommen.

Ein vielversprechender Ansatz um Zellmaterial zu gewinnen, ist die Reprogrammierung von differenzierten Zellen in einen neuen gewünschten Zelltyp. Bereits in den 60er Jahren etablierten Gurdon *et al.* (Gurdon and Uehlinger 1966) eine Methode zur Reprogrammierung des Zellkerns, wobei der Zellkern einer differenzierten somatischen Zelle in einen pluripotenten embryonal-ähnlichen Status (Smith, Luong and Stein 2009) reprogrammiert wird und Embryonen und embryonale Stamm-Zellen (im Folgenden ES-Zellen) entstehen können, die den genetischen Aufbau einer adulten Zelle aufweisen. ES-Zellen können unendlich proliferieren und bleiben dabei pluripotent, das heißt, sie können in jeden Zelltyp des Körpers differenzieren. Durch diese beiden Eigenschaften sind sie eine attraktive Quelle in Bezug auf Forschung, Stammzell-Therapie und Regenerative Medizin (Cezar 2007). Jedoch könnte die Transplantation von undifferenzierten ES-Zellen zu einer Tumorformation führen, was ihren direkten therapeutischen Nutzen ausschließt bzw. stringente Selektionsmechanismen erfordert, die die nicht differenzierten ES-Zellen eliminieren. Nichtsdestotrotz kann eine Reprogrammierung des Zellkerns auf zwei Arten erfolgen: entweder durch die Fusion von somatischen Zellen mit ES-Zellen oder aber durch die Injektion eines Zellkerns aus einer differenzierten Zelle in eine entkernte Oozyte

(somatic-cell nuclear transfer SCNT). Beide Methoden sind jedoch technisch anspruchsvoll und erfordern den Zugang zu ES-Zellen um pluripotente Stammzellen zu generieren, was ein ethisches Problem darstellt. Zusätzlich sind ES-Zellen sehr heterogen (Graf and Stadtfeld 2008). Davon ab ist die klinische Relevanz zweifelhaft, da die Zellfusion zu Polyploidie führt, einer klinisch unverträglichen Eigenschaft.

Die ES-Zellen sollen eigentlich nur als Quelle für die eigentlich gewünschten adulten Zelltypen dienen. Sie müssen daher, nach ihrer Generierung noch in den gewünschten Zelltyp differenziert werden. Die Differenzierung von ES-Zellen in den eigentlich gewünschten somatischen Zelltyp ist ein weiteres Problem. Die Differenzierung von ES-Zellen in ein adultes Stadium ist sehr ineffizient. Zudem können ES-Zellen zwar unbegrenzt proliferieren, die aus ihnen hervorgegangenen differenzierten Zelltypen sterben jedoch bereits nach kurzer Zeit, wodurch das Problem der Versorgung mit genügend Zellmaterial weiterhin bestehen bleibt bzw. der aufwändige, kostspielige und ineffiziente Differenzierungsprozess immer und immer wieder wiederholt werden muss.

Takahashi und Yamanaka revolutionierten 2006 das Feld der Reprogrammierung (Takahashi and Yamanaka 2006), indem sie zeigen konnten, dass es möglich ist durch die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren und die Kultivierung unter ES-Zell Bedingungen, adulte somatische Zellen in pluripotente embryonal-ähnliche Zellen zu konvertieren. Durch diese neue Technik verlor die Stammzellforschung den ethischen Hemmschuh und gewann an breiter Akzeptanz.

In der Arbeit von 2006 identifizierten Takahashi *et al.* 24 Gene, die aufgrund ihrer möglichen Rolle in der Aufrechterhaltung der ES-Zell Identität, möglicherweise Pluripotenz in adulten Zellen induzieren könnten. Sie brachten diese Gene mit Hilfe retroviralier Vektoren in Mausfibroblasten ein, die als Selektionsmarker grün-fluoreszierendes Nanog enthielten, das nur in ES-Zellen exprimiert wird. Obwohl keiner der Faktoren allein in der Lage war die Expression des ES-Selektionsmarkers Nanog zu induzieren, gelang es jedoch unter Verwendung aller 24 Faktoren einige Zellen mit charakteristischen Morphologie und Wachstumseigenschaften einer ES-Zelle zu generieren und nannten diese Induced pluripotent Stem (im Folgenden IPS)-Zellen. Anschließend reduzierten sie das Set der Gene auf vier essentielle Kandidaten OCT3 (oder POU5F1 oder OCT4), Sry box-containing factor 2 (SOX2), Krüppel-like factor 4 (KLF4) und c-Myc. Zellen die diese vier Faktoren exprimieren bilden Teratome aus allen drei Keimblättern (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) *in vivo* und embryonale Körperchen *in vitro* und zeigen dadurch die erfolgreiche Reprogrammierung von differenzierten Zellen in pluripotente Zellen. 2007 konnten sie zeigen, dass die Generierung von IPS-Zellen aus adulten humanen Fibroblasten ebenfalls möglich ist (Takahashi et al. 2007).

Darauf folgend wurde der Effekt der Entfernung von c-Myc von den vier Faktoren untersucht, um die hohe Tumorigenität der IPS-Zellen möglicherweise zu reduzieren (Nakagawa et al. 2008). Zusätzlich konnten Yu *et al.* 2007 ebenfalls die Generierung von iPS-

Zellen aus somatischen humanen Fibroblasten durch die Faktoren OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 zeigen (Yu et al. 2007). Jedoch war die IPS-Generierung ohne Myc noch weniger effizient und die chimären Mäuse starben bereits nach 100 Tagen nach der Geburt aufgrund ihrer Tumorbelastung.

Eines der größten Probleme der IPS-Zellen in Bezug auf die potentielle klinische Anwendung ist ihre Neigung zur Tumorbildung (Laurent et al. 2011). Viele unterschiedliche Ansätze werden verfolgt um ihre Tumorigenität zu verringern. Zum Beispiel will man die zur Reprogrammierung verwendeten Gene durch RNA-Moleküle ersetzen (Gonzalez et al. 2011). Im November 2010 gelang die Erzeugung von IPS-Zellen ohne dauerhafte Integration der Faktoren in das Genom unter Verwendung synthetischer Boten-RNA - sogar effizienter als zuvor (Warren et al. 2010). Anokye-Danso *et al.* zeigten im April 2011 zum ersten Mal, dass eine IPS Generierung ohne die vier Reprogrammierungs-Faktoren möglich ist, indem sie stattdessen kleine regulatorische RNA-Moleküle (microRNAs) verwendeten (Anokye-Danso et al. 2011). Dadurch konnte die Effizienz dramatisch gesteigert werden, jedoch kann für den Transport der microRNAs nicht auf den Einsatz von Viren verzichtet werden.

Neben der Tumorigenität ist die IPS Generierung trotz vielfältiger Optimierung leider sehr ineffizient. Die Reprogrammierung gelingt nur bei einer von tausend Zellen (Sridharan and Plath 2008). Da die IPS-Zellen aber nur die Quelle für die daraus generierten Somazellen sind, ist hier die Effizienz nicht so entscheidend. Das eigentliche Problem ist, dass die anschließende Differenzierung der iPS-Zellen in den gewünschten somatischen Zelltyp noch ineffizienter als die iPS-Generierung selbst ist und die erhoffte Produktion an differenzierter Zellmasse nicht erreicht wird. Zudem ist die Effizienz der Differenzierung von IPS-Zellen in somatische Zellen geringer als die Differenzierung von ES-Zellen in somatische Zellen (Robinton and Daley 2012). Zusätzlich können die iPS-Zellen zwar unbegrenzt proliferieren, jedoch sterben die aus ihnen hervorgehenden differenzierten somatischen Zellen bereits nach kurzer Zeit (Nishikawa et al. 2008). Somit ist es unter den aktuellen Voraussetzungen nicht möglich, die großen Mengen an zur Verwendung für therapeutische Zwecke benötigten Zellmaterials, mit dieser Methode zu generieren (Lou and Liang 2011). Des Weiteren ist die aufwändige, ineffiziente und dadurch langwierige Herstellungs-Prozedur mit enorm hohen Kosten verbunden.

Nichtsdestotrotz öffneten iPS-Zellen ein neues, ethisch besser vertretbares Feld in der Stammzell-Forschung und die Hoffnung auf eine Patienten-spezifische Zell-Therapie (Cesar 2007, Lou and Liang 2011). iPS-Zellen ermöglichen die Behandlung von Patienten mit eigenen Stammzellen, eine Abstoßung durch den Körper oder die Übertragung von Krankheiten wird dadurch enorm reduziert. Sie bieten des Weiteren zum Beispiel die einzigartige Möglichkeit aus den Zellen von betroffenen Patienten generiert, die Ursache und den Verlauf von Erbkrankheiten zu untersuchen und aufzuklären (Zhu et al. 2011).

Ein weiterer enormer Durchbruch und die Aufhebung einer Barriere der Trans-differenzierung gelang Vierbuchen *et al.* 2010 (Vierbuchen et al. 2010). Er konnte die direkte

Konversion einer adulten ausdifferenzierten Zelle in einen anderen differenzierten Zelltyp zeigen ohne den Umweg über ein komplett de-differenziertes Stammzell-Stadium. Einige vor ihm konnten bereits die direkte Reprogrammierung von einem adulten Stadium in ein anderes zeigen, jedoch nur zwischen sehr nah miteinander verwandten Zelltypen, wo die konkrete Unterscheidung aufgrund eindeutiger Charakterisierungen eher schwer fällt. 2008 gelang z.B. die direkte Konversion von Bauchspeicheldrüsenzellen in β -Zellen, die beide aus dem Keimblatt des Endoderms gebildet werden (Zhou et al. 2008). Vierbuchen gelang jedoch als erster die direkte Reprogrammierung von Maus-Fibroblasten in funktionale exzitatorische Neuronen des Zentralen Nervensystems (iN-Zellen), also zwei komplett unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlicher Keimblätter. Die Fibroblasten resultieren aus dem Mesoderm und die Neuronen aus dem Ektoderm. Vierbuchen selektionierte, aus anfangs 19 lentiviral eingebundenen Genen, zuständig für die neuronale Entwicklung und Funktion, die zur Konversion in iN-Zellen essentiellen drei Faktoren *Ascl1*, *Brn2* und *Myt1l* heraus. ES-Zellen können weite Implikationen im Bereich des Verständnisses der neuronalen Entwicklung, der Modellierung neuronaler Krankheiten und der regenerativen Medizin im besonderen Bezug auf neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson haben (Lou and Liang 2011). Allerdings fehlt noch eine Methode der Expansion solcher Zellen. Allgemein jedoch ist der Ansatz der direkten Reprogrammierung viel effizienter als der Umweg über IPS oder ES Zellen. Vierbuchen konnte die maturen Neuronen mit einer Effizienz von 19,5% generieren.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Generierung von physiologischen Zelllinien jeglichen gewünschten Zelltyps ist eine weitere Alternative zu den beiden bereits genannten IPS-Zellen und Zellen aus direkter Konversion um den enorm hohen Bedarf an Zellmaterial zur Verwendung in der Zelltherapie und der regenerativen Medizin zu decken. Dabei ist jedoch die immortalisierte Linie in der Produktion des gewünschten Zellmaterials und Zellmasse, zur therapeutischen Anwendung, mit weitem Abstand am effizientesten und zusätzlich sind die Zellen am besten an die Kultivierungsbedingungen adaptiert, so dass im Gegensatz zu den anderen Herangehensweisen kein signifikanter Zelltod entsteht. Bei den IPS und Differenzierungsansätzen ist die Effizienz in der Praxis ein großes Problem. Die Erzeugung von iPS-Zellen ist sehr zeitaufwändig. Bei den bereits gut etablierten und optimierten Methoden wird nur 1 von 1000 Zellen in eine iPS-Zelle umgewandelt, oft sind es sogar noch weniger (Sridharan and Plath 2008). Die anschließende Differenzierung der IPS Zellen in den gewünschten maturen Zelltyp ist jedoch das eigentliche Problem, weil dieser Prozess noch ineffizienter als die IPS Generierung selbst ist (Robinton and Daley 2012, Nishikawa et al. 2008). Es kann also Monate dauern, bis genügend Zellen für Versuche und Anwendungen zur Verfügung stehen. Da die, aus den IPS-Zellen generierten somatischen Zellen, jedoch eine nur kurze Lebensdauer haben, ist es schwer Zellmaterial über einen so langen Zeitraum anzusammeln. Schließlich häufen sich aktuell die Hinweise, dass iPS-Zellen und embryonale Stamm-Zellen doch nicht so ähnlich sind, wie anfänglich behauptet (Robinton and Daley 2012). Die genauen Analysen des Epigenoms, weisen deutliche

Unterschiede auf. Es scheint das iPS-Zellen deutlich anfälliger für die Mutationen sind, was ihren sicheren therapeutischen Nutzen in Frage stellt (Pera 2011). Des Weiteren konnte für die in dieser Arbeit generierten HUVEC-Zelllinien keine Tumorigenität weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden, was einen weiteren entscheidenden Vorteil im Vergleich zu IPS und Differenzierungsansätzen in Bezug auf klinische Sicherheit darstellt (siehe 3.4.5).

5 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien aus gesunden nativen primären Zellen generiert und die daraus resultierenden Linien weisen daher den physiologischen Phänotyp einer gesunden nativen Zelle auf. Dies ist zum Beispiel essentiell für die Verwendung dieser Linien in der regenerativen Medizin, in der Grundlagenforschung, Target-Identifizierung und in Toxizitäts-Tests um aussagekräftige Resultate zu generieren. Es wäre in Zukunft jedoch auch interessant zu wissen, ob mit dieser Methode aus erkranktem Gewebe ebenfalls Zelllinien generiert werden können, die den kranken Phänotyp trotz, oder besser gesagt durch Immortalisierung konservieren. Mit Hilfe solcher Zelllinien könnten dann Modelle, zum Beispiel zur Untersuchung der Krankheitsursache und der Pathogenese generiert werden und die Wirksamkeit von Medikamenten evaluiert werden. In Bezug auf die hier etablierten Endothelzelllinien wäre der Versuch der Generierung von Linien aus z.B. arteriosklerotischem Endothel interessant. Arteriosklerose ist, bedingt durch ihre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Übergewicht, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Rauchen und Stress die Haupt-Todesursache in der westlichen Welt. Sie kann sich letztendlich in Ischämie, Thrombose, Angina pectoris, Herzinfarkt und Schlaganfall manifestieren. Daher sind das Verständnis der Pathogenese und die Entwicklung von wirksamen Medikamenten und Therapien von enormem wirtschaftlichem Interesse.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Tumorigenität der HMVEC-Linie I46-12 *in vivo* beobachtet (siehe 3.4.5), die vermutlich auf die Kombination der im Genom integrierten Gene zurückzuführen ist (siehe 4.4). Daher muss untersucht werden, ob durch eine Reduzierung der Immortalisierungsfaktoren und somit unter Verwendung einer anderen Genkombination diese Problematik verhindert werden kann. Dabei ist besonders der Effekt der Aussparung der Gene TAG und E7 interessant.

Ferner gelang in dieser Arbeit die Etablierung von porzinen BBB-Linien. Jedoch sollten diese Linien als Modell der humanen BBB dienen, um zum Beispiel den Transport von Medikamenten, Toxinen oder den Mechanismus der Überwindung durch Pathogene zu untersuchen. Dazu ist jedoch der von den Linien generierte Widerstand nicht relevant, da die Barriere-Eigenschaften zu gering sind. Allerdings ist in dieser Arbeit gezeigt worden, dass die Immortalisierung darstellbar ist. Daher sind die nächsten Schritte (a) die Immortalisierung zu optimieren und (b) das System auf die humanen Zellen zu übertragen und zu untersuchen, ob unter der Verwendung von primären humanen BBB-Zellen ein besseres Ergebnis erzielt werden kann. Um möglichst gut den physiologischen Widerstand bzw. die physiologischen Bedingungen zu simulieren, könnten in weiteren Arbeiten Kokulturen generiert werden, die die Komplexität der *in vivo* Situation besser nachbilden und von denen bekannt ist, dass sie einen Effekt auf die Barriere-Eigenschaft der Blut-Hirnschranke haben, wie zum Beispiel Astrozyten, Perizyten und Glattmuskelzellen.

6 Zusammenfassung

Aussagekräftige physiologische endotheliale *in vitro* Testplattformen werden zur Unterstützung der Wirkstoffentwicklung und Therapieevaluierung für kardiovaskuläre Erkrankungen benötigt. Im Rahmen solcher Entwicklungsprozesse ist es für Forschung und Industrie wichtig, mittels biologischer Testverfahren möglichst frühzeitig abzuschätzen, wie sich ein geplantes Produkt in Bezug auf Wirksamkeit, menschliche Gesundheit und die Umwelt auswirken wird. Auf Basis ökonomischer, wissenschaftlicher, gesellschaftlicher und rechtlicher Voraussetzungen besteht eine immer stärkere Notwendigkeit und der Wunsch zellbasierte *in vitro* Testverfahren als Alternative zu Tierversuchen einzusetzen. Ebenfalls werden Endothelzellen in der Forschung als Zellmodell oder um z.B. das vaskuläre System und seine degenerativen Veränderungen *in vitro* zu studieren, benötigt. Zudem ist der Einsatz von Endothelzellen in der regenerativen Medizin und Zelltherapie von hohem Interesse (z.B. zur Vaskularisierung künstlicher Gewebe und Organe).

Für die eben genannten Zwecke werden im Moment entweder klassische Zelllinien oder primäre Zellen verwendet. Den Engpass stellt dabei die Versorgung mit genügend Zellmaterial dar, dass die physiologischen Eigenschaften des nativen Zelltyps aufweist, um aussagekräftige reproduzierbare Erkenntnisse zu generieren, die möglichst nahe der *in vivo* Situation sind.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten neuen Immortalisierungsverfahren gelang die schnelle und effiziente Etablierung einer neuen Kategorie von Säugerzelllinien, die zum einen die Proliferation von klassischen Linien aufweisen, zum anderen jedoch den funktionalen Phänotyp des nativen Zelltyps konservieren. Der Hypothese folgend, dass man zur Etablierung einer funktionalen Zelllinie eine zelltypspezifische Kombination an Immortalisierungsgenen benötigt, wurde in dieser Arbeit eine neue, innovative Screeningmethode nach essentiellen, zelltypspezifischen Genkombinationen entwickelt, die zum einen die Immortalisierung ermöglichen und zum anderen den physiologisch relevanten Phänotyp konservieren. Zur Selektion dieser Genkombinationen, wurden die generierten Endothelzelllinien einer Charakterisierung unterzogen und ihre Expression endothelspezifischer Marker und Funktionen im Vergleich zu dem Verhalten der entsprechenden primären Zellen evaluiert, um ihre physiologische Relevanz zu beurteilen. Im Vergleich zu etablierten Immortalisierungsansätzen, die zu einem veränderten Phänotyp führen, konnte durch die breite Charakterisierung gezeigt werden, dass die etablierten Zelllinien den nativen Phänotyp der primären Zellen durch die Immortalisierung konservieren und alle endothelspezifischen Marker und Funktionen stabil und reproduzierbar exprimieren. Die daraus resultierenden Zelllinien weisen somit eine physiologische Funktionalität und Phänotyp auf, ermöglichen eine unkomplizierte Handhabung und generieren valide Ergebnisse. Sie sind daher sehr gut dazu geeignet, den Engpass in der Versorgung mit relevanten Zellen zu beheben, in vielen unterschiedlichen Disziplinen Anwendung zu finden und somit die Notwendigkeit von Tierversuchen zu reduzieren.

7 Referenzen

- Abbas, T. & A. Dutta (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer*, 9, 400-14.
- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof & D. J. Begley (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37, 13-25.
- Abbott, N. J., L. Ronnback & E. Hansson (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, 7, 41-53.
- Adams, R. H. & K. Alitalo (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 464-78.
- Agarwal, C. & R. L. Eckert (1990) Immortalization of human keratinocytes by simian virus 40 large T-antigen alters keratin gene response to retinoids. *Cancer research*, 50, 5947-53.
- Agarwal, N., E. S. Lippmann & E. V. Shusta (2010) Identification and expression profiling of blood-brain barrier membrane proteins. *Journal of neurochemistry*, 112, 625-35.
- Aguda, B. D., Y. Kim, H. S. Kim, A. Friedman & H. A. Fine (2011) Qualitative network modeling of the Myc-p53 control system of cell proliferation and differentiation. *Biophysical journal*, 101, 2082-91.
- Ahuja, D., M. T. Saenz-Robles & J. M. Pipas (2005) SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, 24, 7729-45.
- Aird, W. C. (2007a) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research*, 100, 158-73.
- (2007b) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation research*, 100, 174-90.
- Alani, R. M., J. Hasskarl, M. Grace, M. C. Hernandez, M. A. Israel & K. Munger (1999) Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9637-41.
- Angel, P. & M. Karin (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta*, 1072, 129-57.
- Anokye-Danso, F., C. M. Trivedi, D. Jühr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P. J. Gruber, J. A. Epstein & E. E. Morrisey (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*, 8, 376-88.

Aressy, B. & B. Ducommun (2008) Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 8, 818-24.

Baena, E., M. Ortiz, A. C. Martinez & I. M. de Alboran (2007) c-Myc is essential for hematopoietic stem cell differentiation and regulates Lin(-)Sca-1(+)c-Kit(-) cell generation through p21. *Experimental hematology*, 35, 1333-43.

Bakris, G. L. (2012) Hypertension in 2011: New insights--from risk factors to treatment implications. *Nature reviews. Cardiology*, 9, 75-7.

Ballabh, P., A. Braun & M. Nedergaard (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 16, 1-13.

Barone, M. V., R. Pepperkok, F. A. Peverali & L. Philipson (1994) Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4985-8.

Barr, F. A. & U. Gruneberg (2007) Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell*, 131, 847-60.

Barrila, J., A. L. Radtke, A. Crabbe, S. F. Sarker, M. M. Herbst-Kralovetz, C. M. Ott & C. A. Nickerson (2010) Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 8, 791-801.

Bartek, J., C. Lukas & J. Lukas (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5, 792-804.

Bartek, J. & J. Lukas (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell*, 3, 421-9.

Bartlett, P. F., H. H. Reid, K. A. Bailey & O. Bernard (1988) Immortalization of mouse neural precursor cells by the c-myc oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 3255-9.

Bates, S., A. C. Phillips, P. A. Clark, F. Stott, G. Peters, R. L. Ludwig & K. H. Vousden (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, 395, 124-5.

Baumann, K. (2011) Cell cycle: the division belt. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12, 622.

Bazzoni, G. (2006) Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thrombosis and haemostasis*, 95, 36-42.

Bechmann, I., I. Galea & V. H. Perry (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends in immunology*, 28, 5-11.

Benezra, R., R. L. Davis, D. Lockshon, D. L. Turner & H. Weintraub (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, 61, 49-59.

Benezra, R., S. Rafii & D. Lyden (2001) The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene*, 20, 8334-41.

Bernas, M. J., F. L. Cardoso, S. K. Daley, M. E. Weinand, A. R. Campos, A. J. Ferreira, J. B. Hoying, M. H. Witte, D. Brites, Y. Persidsky, S. H. Ramirez & M. A. Brito (2010) Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nature protocols*, 5, 1265-72.

Berta, M. A., C. M. Baker, D. L. Cottle & F. M. Watt (2010) Dose and context dependent effects of Myc on epidermal stem cell proliferation and differentiation. *EMBO molecular medicine*, 2, 16-25.

Bi, C. M., S. Q. Zhang, Y. Zhang, S. Y. Peng, L. Wang, Z. X. An, A. Qi & N. Lv (2007) Immortalization of bovine germ line stem cells by c-myc and hTERT. *Animal reproduction science*, 100, 371-8.

Biroccio, A., B. Benassi, S. Amodei, C. Gabellini, D. Del Bufalo & G. Zupi (2001) c-Myc down-regulation increases susceptibility to cisplatin through reactive oxygen species-mediated apoptosis in M14 human melanoma cells. *Molecular pharmacology*, 60, 174-82.

Blagosklonny, M. V. (2005) How Avastin potentiates chemotherapeutic drugs: action and reaction in antiangiogenic therapy. *Cancer biology & therapy*, 4, 1307-10.

Blais, A. & B. D. Dynlacht (2004) Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Current opinion in genetics & development*, 14, 527-32.

Bloom, J. & F. R. Cross (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 149-60.

Bocci, G. & F. Loupakis (2012) The possible role of chemotherapy in antiangiogenic drug resistance. *Medical hypotheses*, 78, 646-8.

Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner & W. E. Wright (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279, 349-52.

Borden, M., S. F. El-Amin, M. Attawia & C. T. Laurencin (2003) Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. *Biomaterials*, 24, 597-609.

Bostrom, K. I., A. Garfinkel, Y. Yao & M. Jumabay (2012) Concise review: applying stem cell biology to vascular structures. *Stem cells*, 30, 386-91.

- Bracken, A. P., M. Ciro, A. Cocito & K. Helin (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends in biochemical sciences*, 29, 409-17.
- Branzei, D. & M. Foiani (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 297-308.
- Briganti, A., A. Salonia, F. Deho, G. Zanni, L. Barbieri, P. Rigatti & F. Montorsi (2005a) Clinical update on phosphodiesterase type-5 inhibitors for erectile dysfunction. *World journal of urology*, 23, 374-84.
- Briganti, A., A. Salonia, A. Gallina, A. Sacca, P. Montorsi, P. Rigatti & F. Montorsi (2005b) Drug Insight: oral phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *Nature clinical practice. Urology*, 2, 239-47.
- Brooksbank, C. (2000) A cell cycle controller rewrites its CV. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1, 3-4.
- Broude, E. V., Z. N. Demidenko, C. Vivo, M. E. Swift, B. M. Davis, M. V. Blagosklonny & I. B. Roninson (2007) p21 (CDKN1A) is a negative regulator of p53 stability. *Cell cycle*, 6, 1468-71.
- Burkhardt, D. L. & J. Sage (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature reviews. Cancer*, 8, 671-82.
- Bushman, F. D. (2003) Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell*, 115, 135-8.
- Campisi, J. & F. d'Adda di Fagagna (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 729-40.
- Cecchelli, R., V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M. P. Dehouck & L. Fenart (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery*, 6, 650-61.
- Cezar, G. G. (2007) Can human embryonic stem cells contribute to the discovery of safer and more effective drugs? *Current opinion in chemical biology*, 11, 405-9.
- Chan, B. & V. P. Sukhatme (2009) Suppression of Tie-1 in endothelial cells in vitro induces a change in the genome-wide expression profile reflecting an inflammatory function. *FEBS letters*, 583, 1023-8.
- Chen, C. A., T. Y. Wang, S. Varadharaj, L. A. Reyes, C. Hemann, M. A. Talukder, Y. R. Chen, L. J. Druhan & J. L. Zweier (2010) S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature*, 468, 1115-8.
- Chen, H. Z., S. Y. Tsai & G. Leone (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature reviews. Cancer*, 9, 785-97.

Chen, J. D. & T. Van Dyke (1991) Uniform cell-autonomous tumorigenesis of the choroid plexus by papovavirus large T antigens. *Molecular and cellular biology*, 11, 5968-76.

Chen, Y. & R. Y. Poon (2008) The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 5016-29.

Chen, Y. & Y. Sanchez (2004) Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA repair*, 3, 1025-32.

Cheng, C., R. van Haperen, M. de Waard, L. C. van Damme, D. Tempel, L. Hanemaaijer, G. W. van Cappellen, J. Bos, C. J. Slager, D. J. Duncker, A. F. van der Steen, R. de Crom & R. Krams (2005) Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood*, 106, 3691-8.

Chi, J. T., H. Y. Chang, G. Haraldsen, F. L. Jahnsen, O. G. Troyanskaya, D. S. Chang, Z. Wang, S. G. Rockson, M. van de Rijn, D. Botstein & P. O. Brown (2003) Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10623-8.

Christmann, M., M. T. Tomicic, D. Aasland & B. Kaina (2007) A role for UV-light-induced c-Fos: Stimulation of nucleotide excision repair and protection against sustained JNK activation and apoptosis. *Carcinogenesis*, 28, 183-90.

Chung, A. S., J. Lee & N. Ferrara (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 10, 505-14.

Classon, M. & E. Harlow (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2, 910-7.

Cleaver, O. & D. A. Melton (2003) Endothelial signaling during development. *Nature medicine*, 9, 661-8.

Cole, M. D. & V. H. Cowling (2008) Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 810-5.

Conacci-Sorrell, M., C. Ngouenet & R. N. Eisenman (2010) Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell*, 142, 480-93.

Cooper, S. (1987) On G0 and cell cycle controls. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 7, 220-3.

De Luca, A., A. Baldi, V. Esposito, C. M. Howard, L. Bagella, P. Rizzo, M. Caputi, H. I. Pass, G. G. Giordano, F. Baldi, M. Carbone & A. Giordano (1997) The retinoblastoma gene family

pRb/p105, p107, pRb2/p130 and simian virus-40 large T-antigen in human mesotheliomas. *Nature medicine*, 3, 913-6.

Dejana, E. (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5, 261-70.

Delenda, C. (2004) Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *The journal of gene medicine*, 6 Suppl 1, S125-38.

DeSal, G., M. Loda & M. Pagano (1996) Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. *Critical reviews in oncogenesis*, 7, 127-42.

Dick, F. A. & N. J. Dyson (2002) Three regions of the pRB pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins. *Journal of virology*, 76, 6224-34.

Dirks, P. B., J. T. Rutka, S. L. Hubbard, S. Mondal & P. A. Hamel (1998) The E2F-family proteins induce distinct cell cycle regulatory factors in p16-arrested, U343 astrocytoma cells. *Oncogene*, 17, 867-76.

Donjerkovic, D. & D. W. Scott (2000) Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell research*, 10, 1-16.

Dosch, J. & B. Kaina (1996) Induction of c-fos, c-jun, junB and junD mRNA and AP-1 by alkylating mutagens in cells deficient and proficient for the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and its relationship to cell death, mutation induction and chromosomal instability. *Oncogene*, 13, 1927-35.

Drayton, S. & G. Peters (2002) Immortalisation and transformation revisited. *Current opinion in genetics & development*, 12, 98-104.

Drayton, S., J. Rowe, R. Jones, R. Vatcheva, D. Cuthbert-Heavens, J. Marshall, M. Fried & G. Peters (2003) Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer cell*, 4, 301-10.

Eglen, R. & T. Reisine (2011) Primary cells and stem cells in drug discovery: emerging tools for high-throughput screening. *Assay and drug development technologies*, 9, 108-24.

Eglen, R. M., A. Gilchrist & T. Reisine (2008) An overview of drug screening using primary and embryonic stem cells. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 11, 566-72.

el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler & B. Vogelstein (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-25.

El Ghalbzouri, A., S. Commandeur, M. H. Rietveld, A. A. Mulder & R. Willemze (2009) Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. *Biomaterials*, 30, 71-8.

- Elkeles, A., T. Juven-Gershon, D. Israeli, S. Wilder, A. Zalcenstein & M. Oren (1999) The c-fos proto-oncogene is a target for transactivation by the p53 tumor suppressor. *Molecular and cellular biology*, 19, 2594-600.
- Erben, M., S. Decker, H. Franke & H. J. Galla (1995) Electrical resistance measurements on cerebral capillary endothelial cells--a new technique to study small surface areas. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 30, 227-38.
- Fan, L. X., X. Li, B. Magenheimer & J. P. Calvet (2012) Inhibition of histone deacetylases targets the transcription regulator Id2 to attenuate cystic epithelial cell proliferation. *Kidney international*, 81, 76-85.
- Farnham, P. J. (2009) Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nature reviews. Genetics*, 10, 605-16.
- Farwell, D. G., K. A. Shera, J. I. Koop, G. A. Bonnet, C. P. Matthews, G. W. Reuther, M. D. Coltrera, J. K. McDougall & A. J. Klingelutz (2000) Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *The American journal of pathology*, 156, 1537-47.
- Ferkowicz, M. J. & M. C. Yoder (2005) Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Experimental hematology*, 33, 1041-7.
- Fernandez, P. C., S. R. Frank, L. Wang, M. Schroeder, S. Liu, J. Greene, A. Cocito & B. Amati (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & development*, 17, 1115-29.
- Ferrara, N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature reviews. Cancer*, 2, 795-803.
- Ferrara, N., K. J. Hillan & W. Novotny (2005) Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and biophysical research communications*, 333, 328-35.
- Ferrero, E., M. E. Ferrero, R. Pardi & M. R. Zocchi (1995) The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS letters*, 374, 323-6.
- Frosen, J., R. Tulamo, A. Paetau, E. Laaksamo, M. Korja, A. Laakso, M. Niemela & J. Hernesniemi (2012) Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta neuropathologica*, 123, 773-86.
- Fukasawa, K. (2007) Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nature reviews. Cancer*, 7, 911-24.

- Fukuhara, S., K. Sako, T. Minami, K. Noda, H. Z. Kim, T. Kodama, M. Shibuya, N. Takakura, G. Y. Koh & N. Mochizuki (2008) Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nature cell biology*, 10, 513-26.
- Gartel, A. L. & A. L. Tyner (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Experimental cell research*, 246, 280-9.
- Gatti, G., G. Maresca, M. Natoli, F. Florenzano, A. Nicolini, A. Felsani & I. D'Agnano (2009) MYC prevents apoptosis and enhances endoreduplication induced by paclitaxel. *PloS one*, 4, e5442.
- Gavet, O. & J. Pines (2010) Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Developmental cell*, 18, 533-43.
- Gehad, A., N. A. Al-Banna, M. Vaci, A. C. Issekutz, K. Mohan, M. Latta & T. B. Issekutz (2012) Differing Requirements for CCR4, E-Selectin, and alpha4beta1 for the Migration of Memory CD4 and Activated T Cells to Dermal Inflammation. *Journal of immunology*.
- Ghofrani, H. A., I. H. Osterloh & F. Grimminger (2006) Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature reviews. Drug discovery*, 5, 689-702.
- Giarre, M., S. Caldeira, I. Malanchi, F. Ciccolini, M. J. Leao & M. Tommasino (2001) Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *Journal of virology*, 75, 4705-12.
- Gil, J., P. Kerai, M. Lleonart, D. Bernard, J. C. Cigudosa, G. Peters, A. Carnero & D. Beach (2005) immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer research*, 65, 2179-85.
- Gil, J. & G. Peters (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 667-77.
- Gilinger, G. & J. C. Alwine (1993) Transcriptional activation by simian virus 40 large T antigen: requirements for simple promoter structures containing either TATA or initiator elements with variable upstream factor binding sites. *Journal of virology*, 67, 6682-8.
- Glass, C. K., K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto & F. H. Gage (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-34.
- Goldbard, S. (2006) Bringing primary cells to mainstream drug development and drug testing. *Current opinion in drug discovery & development*, 9, 110-6.
- Gollahon, L. S., E. Kraus, T. A. Wu, S. O. Yim, L. C. Strong, J. W. Shay & M. A. Tainsky (1998) Telomerase activity during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome skin fibroblasts. *Oncogene*, 17, 709-17.

Gonzalez, F., S. Boue & J. C. Izpisua Belmonte (2011) Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nature reviews. Genetics*, 12, 231-42.

Goodrich, D. W. (2006) The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene*, 25, 5233-43.

Goodrich, D. W. & W. H. Lee (1992) Abrogation by c-myc of G1 phase arrest induced by RB protein but not by p53. *Nature*, 360, 177-9.

Gordon, G. M. & W. Du (2011) Conserved RB functions in development and tumor suppression. *Protein & cell*, 2, 864-78.

Graf, T. & M. Stadtfeld (2008) Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell stem cell*, 3, 480-3.

Griffith, L. G. & G. Naughton (2002) Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*, 295, 1009-14.

Griffith, L. G. & M. A. Swartz (2006) Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 211-24.

Guccione, E., F. Martinato, G. Finocchiaro, L. Luzi, L. Tizzoni, V. Dall' Olio, G. Zardo, C. Nervi, L. Bernard & B. Amati (2006) Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nature cell biology*, 8, 764-70.

Guller, M., K. Toualbi-Abed, A. Legrand, L. Michel, A. Mauviel, D. Bernuau & F. Daniel (2008) c-Fos overexpression increases the proliferation of human hepatocytes by stabilizing nuclear Cyclin D1. *World journal of gastroenterology : WJG*, 14, 6339-46.

Gumireddy, K., N. Ikegaki, P. C. Phillips, L. N. Sutton & C. D. Reddy (2003) Effect of 20-epi-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the proliferation of human neuroblastoma: role of cell cycle regulators and the Myc-Ik2 pathway. *Biochemical pharmacology*, 65, 1943-55.

Gurdon, J. B. & V. Uehlinger (1966) "Fertile" intestine nuclei. *Nature*, 210, 1240-1.

Haga, K., S. Ohno, T. Yugawa, M. Narisawa-Saito, M. Fujita, M. Sakamoto, D. A. Galloway & T. Kiyono (2007) Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer science*, 98, 147-54.

Halbert, C. L., G. W. Demers & D. A. Galloway (1991) The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal of virology*, 65, 473-8.

Hartmann, C., J. El-Gindi, C. Lohmann, M. Lischper, P. Zeni & H. J. Galla (2009) TIMP-3: a novel target for glucocorticoid signaling at the blood-brain barrier. *Biochemical and biophysical research communications*, 390, 182-6.

- Hartmann, C., A. Zozulya, J. Wegener & H. J. Galla (2007) The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study. *Experimental cell research*, 313, 1318-25.
- Harvey, D. M. & A. J. Levine (1991) p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes & development*, 5, 2375-85.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz & M. Oren (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387, 296-9.
- Hengstschlager, M., E. Hengstschlager-Ottinad, O. Pusch & E. Wawra (1996) The role of p16 in the E2F-dependent thymidine kinase regulation. *Oncogene*, 12, 1635-43.
- Herbert, S. P. & D. Y. Stainier (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12, 551-64.
- Hinds, P. W., S. Mitnacht, V. Dulic, A. Arnold, S. I. Reed & R. A. Weinberg (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, 70, 993-1006.
- Hirashima, M. & T. Suda (2006) Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis. *Endothelium : journal of endothelial cell research*, 13, 137-45.
- Hochegger, H., S. Takeda & T. Hunt (2008) Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 910-6.
- Hollander, A. P., S. C. Dickinson, T. J. Sims, P. Brun, R. Cortivo, E. Kon, M. Marcacci, S. Zanasi, A. Borriore, C. De Luca, A. Pavesio, C. Soranzo & G. Abatangelo (2006) Maturation of tissue engineered cartilage implanted in injured and osteoarthritic human knees. *Tissue engineering*, 12, 1787-98.
- Holmes, K., O. L. Roberts, A. M. Thomas & M. J. Cross (2007) Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling*, 19, 2003-12.
- Horrocks, C., R. Halse, R. Suzuki & P. R. Shepherd (2003) Human cell systems for drug discovery. *Current opinion in drug discovery & development*, 6, 570-5.
- Hu, L., M. Hatano, U. Ruther & T. Tokuhiya (1996) Overexpression of c-Fos induces apoptosis of CD43+ pro-B cells. *Journal of immunology*, 157, 3804-11.
- Huang, M. J., Y. C. Cheng, C. R. Liu, S. Lin & H. E. Liu (2006) A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Experimental hematology*, 34, 1480-9.

Iavarone, A., P. Garg, A. Lasorella, J. Hsu & M. A. Israel (1994) The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes & development*, 8, 1270-84.

Ikawa, T., M. Ikeda, A. Yamaguchi, W. C. Tsai, N. Tamura, N. Seta, M. Trucksess, R. B. Raybourne & D. T. Yu (1998) Expression of arthritis-causing HLA-B27 on Hela cells promotes induction of c-fos in response to in vitro invasion by *Salmonella typhimurium*. *The Journal of clinical investigation*, 101, 263-72.

Issekutz, A. C. & T. B. Issekutz (2002) The role of E-selectin, P-selectin, and very late activation antigen-4 in T lymphocyte migration to dermal inflammation. *Journal of immunology*, 168, 1934-9.

Jain, R. K., D. G. Duda, C. G. Willett, D. V. Sahani, A. X. Zhu, J. S. Loeffler, T. T. Batchelor & A. G. Sorensen (2009) Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 6, 327-38.

Jeliazkova-Mecheva, V. V. & D. J. Bobilya (2003) A porcine astrocyte/endothelial cell co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain research. Brain research protocols*, 12, 91-8.

Junttila, M. R. & G. I. Evan (2009) p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature reviews. Cancer*, 9, 821-9.

Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 3, 422-33.

Kalra, N. & V. Kumar (2004) c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*, 279, 25313-9.

Kamijo, T., J. D. Weber, G. Zambetti, F. Zindy, M. F. Roussel & C. J. Sherr (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 8292-7.

Kamijo, T., F. Zindy, M. F. Roussel, D. E. Quelle, J. R. Downing, R. A. Ashmun, G. Grosveld & C. J. Sherr (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 91, 649-59.

Kan, C. Y., V. W. Wen, E. Pasquier, K. Jankowski, M. Chang, L. A. Richards, M. Kavallaris & K. L. Mackenzie (2012) Endothelial cell dysfunction and cytoskeletal changes associated with repression of p16(INK4a) during immortalization. *Oncogene*.

Kastan, M. B., A. I. Radin, S. J. Kuerbitz, O. Onyekwere, C. A. Wolkow, C. I. Civin, K. D. Stone, T. Woo, Y. Ravindranath & R. W. Craig (1991) Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer research*, 51, 4279-86.

Kerr, L. D., D. B. Miller & L. M. Matrisian (1990) TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell*, 61, 267-78.

King, R. W., P. K. Jackson & M. W. Kirschner (1994) Mitosis in transition. *Cell*, 79, 563-71.

Kleinjan, D. J. & V. van Heyningen (1998) Position effect in human genetic disease. *Human molecular genetics*, 7, 1611-8.

Kolly, C., M. M. Suter & E. J. Muller (2005) Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. *The Journal of investigative dermatology*, 124, 1014-25.

Konisti, S., S. Kiriakidis & E. M. Paleolog (2012) Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 8, 153-62.

Korff, T., T. Krauss & H. G. Augustin (2004) Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. *Experimental cell research*, 297, 415-23.

Koshland, D. (1994) Mitosis: back to the basics. *Cell*, 77, 951-4.

Kroll, S., J. El-Gindi, G. Thanabalasundaram, P. Panpumthong, S. Schrot, C. Hartmann & H. J. Galla (2009) Control of the blood-brain barrier by glucocorticoids and the cells of the neurovascular unit. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 228-39.

Kumhashi, N., M. Ochi, H. Kataoka, Y. Uchio, H. Kakimaru, K. Sugawara & K. Enomoto (2004) Involvement of ATP, increase of intracellular calcium and the early expression of c-fos in the repair of rat fetal articular cartilage. *Cell and tissue research*, 317, 117-28.

Kumano, M., T. Nakagawa, Y. Imamura, I. Galli, H. Ariga & S. M. Iguchi-Ariga (1992) Stimulation of SV40 DNA replication by the human c-myc enhancer. *FEBS letters*, 309, 146-52.

Kume, T. (2010) Specification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells during embryonic development. *Histology and histopathology*, 25, 637-46.

Kussie, P. H., S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine & N. P. Pavletich (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274, 948-53.

Kyan-Aung, U., D. O. Haskard, R. N. Poston, M. H. Thornhill & T. H. Lee (1991) Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells in vitro and are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation in vivo. *Journal of immunology*, 146, 521-8.

- Laib, A. M., A. Bartol, A. Alajati, T. Korff, H. Weber & H. G. Augustin (2009) Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nature protocols*, 4, 1202-15.
- Lam, M. H. & J. M. Rosen (2004) Chk1 versus Cdc25: checking one's levels of cellular proliferation. *Cell cycle*, 3, 1355-7.
- Lapenna, S. & A. Giordano (2009) Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 8, 547-66.
- LaRue, A. C., R. Lansford & C. J. Drake (2003) Circulating blood island-derived cells contribute to vasculogenesis in the embryo proper. *Developmental biology*, 262, 162-72.
- Lasorella, A., A. Iavarone & M. A. Israel (1996) Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Molecular and cellular biology*, 16, 2570-8.
- Lasorella, A., M. Nosedà, M. Beyna, Y. Yokota & A. Iavarone (2000) Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature*, 407, 592-8.
- Lasorella, A., T. Uo & A. Iavarone (2001) Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene*, 20, 8326-33.
- Laurent, L. C., I. Ulitsky, I. Slavin, H. Tran, A. Schork, R. Morey, C. Lynch, J. V. Harness, S. Lee, M. J. Barrero, S. Ku, M. Martynova, R. Semechkin, V. Galat, J. Gottesfeld, J. C. Izpisua Belmonte, C. Murry, H. S. Keirstead, H. S. Park, U. Schmidt, A. L. Laslett, F. J. Muller, C. M. Nievergelt, R. Shamir & J. F. Loring (2011) Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell*, 8, 106-18.
- Lavia, P. & P. Jansen-Durr (1999) E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 21, 221-30.
- Lavialle, C., N. Modjtahedi, R. Cassingena & O. Brison (1988) High c-myc amplification level contributes to the tumorigenic phenotype of the human breast carcinoma cell line SW 613-S. *Oncogene*, 3, 335-9.
- Lee, S. W., W. J. Kim, Y. K. Choi, H. S. Song, M. J. Son, I. H. Gelman, Y. J. Kim & K. W. Kim (2003) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nature medicine*, 9, 900-6.
- Lee, Y. C., S. L. Asa & D. J. Drucker (1992) Glucagon gene 5'-flanking sequences direct expression of simian virus 40 large T antigen to the intestine, producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 267, 10705-8.
- Leon, J., N. Ferrandiz, J. C. Acosta & M. D. Delgado (2009) Inhibition of cell differentiation: a critical mechanism for MYC-mediated carcinogenesis? *Cell cycle*, 8, 1148-57.
- Levine, A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-31.

Levine, A. J., J. Momand & C. A. Finlay (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351, 453-6.

Levine, A. J. & M. Oren (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer*, 9, 749-58.

Li, K., Y. Blum, A. Verma, Z. Liu, K. Pramanik, N. R. Leigh, C. Z. Chun, G. V. Samant, B. Zhao, M. K. Garnaas, M. A. Horswill, S. A. Stanhope, P. E. North, R. Q. Miao, G. A. Wilkinson, M. Affolter & R. Ramchandran (2010) A noncoding antisense RNA in tie-1 locus regulates tie-1 function in vivo. *Blood*, 115, 133-9.

Lian, J. B., G. S. Stein, R. Bortell & T. A. Owen (1991) Phenotype suppression: a postulated molecular mechanism for mediating the relationship of proliferation and differentiation by Fos/Jun interactions at AP-1 sites in steroid responsive promoter elements of tissue-specific genes. *Journal of cellular biochemistry*, 45, 9-14.

Linder, S. & H. Marshall (1990) immortalization of primary cells by DNA tumor viruses. *Experimental cell research*, 191, 1-7.

Linke, S. P., M. P. Harris, S. E. Neugebauer, K. C. Clarkin, H. M. Shepard, D. C. Maneval & G. M. Wahl (1997) p53-mediated accumulation of hypophosphorylated pRb after the G1 restriction point fails to halt cell cycle progression. *Oncogene*, 15, 337-45.

Lobrich, M. & P. A. Jeggo (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nature reviews. Cancer*, 7, 861-9.

Lou, Y. J. & X. G. Liang (2011) Embryonic stem cell application in drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*, 32, 152-9.

Lutterbach, B. & S. R. Hann (1997) Overexpression of c-Myc and cell immortalization alters c-Myc phosphorylation. *Oncogene*, 14, 967-75.

Lyden, D., A. Z. Young, D. Zagzag, W. Yan, W. Gerald, R. O'Reilly, B. L. Bader, R. O. Hynes, Y. Zhuang, K. Manova & R. Benezra (1999) Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, 401, 670-7.

Lynch, S. S. & C. M. Cheng (2007) Bevacizumab for neovascular ocular diseases. *The Annals of pharmacotherapy*, 41, 614-25.

Mailliez, A., C. Baldini, J. T. Van, V. Servent, Y. Mallet & J. Bonnetterre (2010) Nasal septum perforation: a side effect of bevacizumab chemotherapy in breast cancer patients. *British journal of cancer*, 103, 772-5.

Maitland, N. J., C. A. Macintosh, C. Schmitz & S. H. Lang (2004) immortalization of human prostate cells with the human papillomavirus type 16 E6 gene. *Methods in molecular medicine*, 88, 275-85.

Malumbres, M. & M. Barbacid (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1, 222-31.

--- (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 9, 153-66.

Manning, A. L. & N. J. Dyson (2012) RB: mitotic implications of a tumour suppressor. *Nature reviews. Cancer*, 12, 220-6.

Martinato, F., M. Cesaroni, B. Amati & E. Guccione (2008) Analysis of Myc-induced histone modifications on target chromatin. *PloS one*, 3, e3650.

Massague, J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432, 298-306.

Masumori, N., T. Z. Thomas, P. Chaurand, T. Case, M. Paul, S. Kasper, R. M. Caprioli, T. Tsukamoto, S. B. Shappell & R. J. Matusik (2001) A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. *Cancer research*, 61, 2239-49.

Mathon, N. F. & A. C. Lloyd (2001) Cell senescence and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1, 203-13.

Matsumura, T., M. Takesue, K. A. Westerman, T. Okitsu, M. Sakaguchi, T. Fukazawa, T. Totsugawa, H. Noguchi, S. Yamamoto, D. B. Stolz, N. Tanaka, P. Leboulch & N. Kobayashi (2004) Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation*, 77, 1357-65.

Matter, K. & M. S. Balda (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4, 225-36.

May, T., H. Hauser & D. Wirth (2007) In vitro expansion of tissue cells by conditional proliferation. *Methods in molecular medicine*, 140, 1-15.

McCarthy, N. (2012) Cell cycle: A WEE pointer. *Nature reviews. Cancer*.

Meek, D. W. (2009) Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature reviews. Cancer*, 9, 714-23.

Meisner, L. F., S. Q. Wu, B. J. Christian & C. A. Reznikoff (1988) Cytogenetic instability with balanced chromosome changes in an SV40 transformed human uroepithelial cell line. *Cancer research*, 48, 3215-20.

Melnikova, I. (2005) Wet age-related macular degeneration. *Nature reviews. Drug discovery*, 4, 711-2.

Menendez, D., A. Inga & M. A. Resnick (2009) The expanding universe of p53 targets. *Nature reviews. Cancer*, 9, 724-37.

Metz, T., A. W. Harris & J. M. Adams (1995) Absence of p53 allows direct immortalization of hematopoietic cells by the myc and raf oncogenes. *Cell*, 82, 29-36.

Meyer, N. & L. Z. Penn (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews. Cancer*, 8, 976-90.

Michael, D. & M. Oren (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in cancer biology*, 13, 49-58.

Mihara, K., X. R. Cao, A. Yen, S. Chandler, B. Driscoll, A. L. Murphree, A. T'Ang & Y. K. Fung (1989) Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science*, 246, 1300-3.

Milde-Langosch, K., H. Roder, B. Andritzky, B. Aslan, G. Hemminger, A. Brinkmann, C. M. Bamberger, T. Loning & A. M. Bamberger (2004) The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast cancer research and treatment*, 86, 139-52.

Millar, J. B. & P. Russell (1992) The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, 68, 407-10.

Miyasaka, M. & T. Tanaka (2004) Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews. Immunology*, 4, 360-70.

Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George & A. J. Levine (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69, 1237-45.

Monfort, A., M. Soriano-Navarro, J. M. Garcia-Verdugo & A. Izeta (2012) Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.

Munro, S., S. M. Carr & N. B. La Thangue (2012) Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene*.

Murre, C., G. Bain, M. A. van Dijk, I. Engel, B. A. Furnari, M. E. Massari, J. R. Matthews, M. W. Quong, R. R. Rivera & M. H. Stuiver (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1218, 129-35.

Murre, C., P. S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, C. V. Cabrera, J. N. Buskin, S. D. Hauschka, A. B. Lassar & et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58, 537-44.

Nair, S. K. & S. K. Burley (2003) X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*, 112, 193-205.

- Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa & S. Yamanaka (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, 26, 101-6.
- Nakagawa, S., M. A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka & M. Niwa (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry international*, 54, 253-63.
- Nakayama, K. I. & K. Nakayama (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6, 369-81.
- Nicholas, C. R. & A. R. Kriegstein (2010) Regenerative medicine: Cell reprogramming gets direct. *Nature*, 463, 1031-2.
- Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, M. Smeets, L. Hengst, C. Prives & S. I. Reed (1998) Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and cellular biology*, 18, 629-43.
- Nishikawa, S., R. A. Goldstein & C. R. Nierras (2008) The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 725-9.
- Norton, J. D. (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *Journal of cell science*, 113 (Pt 22), 3897-905.
- Norton, J. D. & G. T. Atherton (1998) Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Molecular and cellular biology*, 18, 2371-81.
- Norwitz, E. R., S. Xu, J. Xu, L. B. Spiryda, J. S. Park, K. H. Jeong, E. A. McGee & U. B. Kaiser (2002) Direct binding of AP-1 (Fos/Jun) proteins to a SMAD binding element facilitates both gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- and activin-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *The Journal of biological chemistry*, 277, 37469-78.
- O'Toole, P. J., T. Inoue, L. Emerson, I. E. Morrison, A. R. Mackie, R. J. Cherry & J. D. Norton (2003) Id proteins negatively regulate basic helix-loop-helix transcription factor function by disrupting subnuclear compartmentalization. *The Journal of biological chemistry*, 278, 45770-6.
- Oliner, J. D., J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler & B. Vogelstein (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 362, 857-60.
- Pai, S. R. & R. C. Bird (1994) c-fos expression is required during all phases of the cell cycle during exponential cell proliferation. *Anticancer research*, 14, 985-94.

Papadimitropoulos, A., A. Scherberich, S. Guven, N. Theilgaard, H. J. Crooijmans, F. Santini, K. Scheffler, A. Zallone & I. Martin (2011) A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells. *European cells & materials*, 21, 445-58; discussion 458.

Pera, M. F. (2011) Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature*, 471, 46-7.

Peterson, S. R., D. M. Gadbois, E. M. Bradbury & P. M. Kraemer (1995) Immortalization of human fibroblasts by SV40 large T antigen results in the reduction of cyclin D1 expression and subunit association with proliferating cell nuclear antigen and Waf1. *Cancer research*, 55, 4651-7.

Peverali, F. A., T. Ramqvist, R. Saffrich, R. Pepperkok, M. V. Barone & L. Philipson (1994) Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins. *The EMBO journal*, 13, 4291-301.

Pitlick, J. M., K. F. Vecera, K. N. Barnes, J. W. Reski & A. B. Forinash (2012) Bevacizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *The Annals of pharmacotherapy*, 46, 290-6.

Pober, J. S. & W. C. Sessa (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 7, 803-15.

Polager, S. & D. Ginsberg (2009) p53 and E2f: partners in life and death. *Nature reviews. Cancer*, 9, 738-48.

Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. J. Liegeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlov, H. W. Lee, C. Cordon-Cardo & R. A. DePinho (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92, 713-23.

Potente, M., H. Gerhardt & P. Carmeliet (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146, 873-87.

Rahman, R., S. Smith, C. Rahman & R. Grundy (2010) Antiangiogenic therapy and mechanisms of tumor resistance in malignant glioma. *Journal of oncology*, 2010, 251231.

Reed, S. I. (2003) Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4, 855-64.

Riley, T., E. Sontag, P. Chen & A. Levine (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 402-12.

Risau, W. (1995) Differentiation of endothelium. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9, 926-33.

Robinton, D. A. & G. Q. Daley (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481, 295-305.

- Rocha, V. Z. & P. Libby (2009) Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology*, 6, 399-409.
- Rohaly, G., K. Korf, S. Dehde & I. Dornreiter (2010) Simian virus 40 activates ATR-Delta p53 signaling to override cell cycle and DNA replication control. *Journal of virology*, 84, 10727-47.
- Rudolph, J. (2007) Inhibiting transient protein-protein interactions: lessons from the Cdc25 protein tyrosine phosphatases. *Nature reviews. Cancer*, 7, 202-11.
- Ruzinova, M. B. & R. Benezra (2003) Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends in cell biology*, 13, 410-8.
- Sahin, E. & R. A. Depinho (2012) Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13, 397-404.
- Salonia, A., P. Rigatti & F. Montorsi (2003) Sildenafil in erectile dysfunction: a critical review. *Current medical research and opinion*, 19, 241-62.
- Sarbia, M., C. Loberg, M. Wolter, J. Arjumand, H. Heep, G. Reifemberger & H. E. Gabbert (1999) Expression of Bcl-2 and amplification of c-myc are frequent in basaloid squamous cell carcinomas of the esophagus. *The American journal of pathology*, 155, 1027-32.
- Sato, T. N., Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau & Y. Qin (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, 376, 70-4.
- Scharpfenecker, M., U. Fiedler, Y. Reiss & H. G. Augustin (2005) The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *Journal of cell science*, 118, 771-80.
- Scherdin, U., M. Steffen, M. Dietel, W. Boecker, M. Breindl & F. Holzel (1990) Elevated expression of v-mos is correlated with altered differentiation of carcinoma cells. *Oncogene*, 5, 1619-27.
- Schermuly, R. T., H. A. Ghofrani, M. R. Wilkins & F. Grimminger (2011) Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature reviews. Cardiology*, 8, 443-55.
- Schmidt, D., C. Breymann, A. Weber, C. I. Guenter, S. Neuenschwander, G. Zund, M. Turina & S. P. Hoerstrup (2004) Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts. *The Annals of thoracic surgery*, 78, 2094-8.
- Schmitt, C. A. (2003) Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3, 286-95.
- Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker & F. Bushman (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110, 521-9.

- Schrot, S., C. Weidenfeller, T. E. Schaffer, H. Robenek & H. J. Galla (2005) Influence of hydrocortisone on the mechanical properties of the cerebral endothelium in vitro. *Biophysical journal*, 89, 3904-10.
- Schuldt, A. (2011) Cell cycle: E2F1 ensures the endocycle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12, 768.
- Scott, D. L., F. Wolfe & T. W. Huizinga (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 376, 1094-108.
- Shaulian, E. & M. Karin (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20, 2390-400.
- (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology*, 4, E131-6.
- Sherr, C. J. (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 731-7.
- (2006) Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature reviews. Cancer*, 6, 663-73.
- Shibuya, M., N. Ito & L. Claesson-Welsh (1999) Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Current topics in microbiology and immunology*, 237, 59-83.
- Shojaei, F. (2012) Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer letters*, 320, 130-7.
- Sivaraman, A., J. K. Leach, S. Townsend, T. Iida, B. J. Hogan, D. B. Stolz, R. Fry, L. D. Samson, S. R. Tannenbaum & L. G. Griffith (2005) A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Current drug metabolism*, 6, 569-91.
- Smith, K. P., M. X. Luong & G. S. Stein (2009) Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *Journal of cellular physiology*, 220, 21-9.
- Smith, M. L., T. S. Olson & K. Ley (2004) CXCR2- and E-selectin-induced neutrophil arrest during inflammation in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 200, 935-9.
- Sobue, K., N. Yamamoto, K. Yoneda, M. E. Hodgson, K. Yamashiro, N. Tsuruoka, T. Tsuda, H. Katsuya, Y. Miura, K. Asai & T. Kato (1999) Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neuroscience research*, 35, 155-64.
- Sorensen, C. S. & R. G. Syljuasen (2012) Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic acids research*, 40, 477-86.
- Sridharan, R. & K. Plath (2008) Illuminating the black box of reprogramming. *Cell stem cell*, 2, 295-7.

Stacey, G. & C. MacDonald (2001) Immortalisation of primary cells. *Cell biology and toxicology*, 17, 231-46.

Stein, B., A. S. Baldwin, Jr., D. W. Ballard, W. C. Greene, P. Angel & P. Herrlich (1993) Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *The EMBO journal*, 12, 3879-91.

Sterling, J., D. Bojanic, R. M. Eglen, S. Heyse & B. Strulovici (2008) Current trends in high-throughput screening. *Assay and drug development technologies*, 6, 491-504.

Stiewe, T. (2007) The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer*, 7, 165-8.

Strait, K. A., B. Dabbas, E. H. Hammond, C. T. Warnick, S. J. Istrup & C. D. Ford (2002) Cell cycle blockade and differentiation of ovarian cancer cells by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A are associated with changes in p21, Rb, and Id proteins. *Molecular cancer therapeutics*, 1, 1181-90.

Strauss, M. & B. E. Griffin (1990) Cellular immortalization--an essential step or merely a risk factor in DNA virus-induced transformation? *Cancer cells*, 2, 360-5.

Stubdal, H., J. Zalvide, K. S. Campbell, C. Schweitzer, T. M. Roberts & J. A. DeCaprio (1997) Inactivation of pRB-related proteins p130 and p107 mediated by the J domain of simian virus 40 large T antigen. *Molecular and cellular biology*, 17, 4979-90.

Sugihara, E., T. Shimizu, K. Kojima, N. Onishi, K. Kai, J. Ishizawa, K. Nagata, N. Hashimoto, H. Honda, M. Kanno, M. Miwa, S. Okada, M. Andreeff & H. Saya (2012) Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene*, 31, 2849-61.

Sun, A., L. Bagella, S. Tutton, G. Romano & A. Giordano (2007) From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 102, 1400-4.

Sun, X. H., N. G. Copeland, N. A. Jenkins & D. Baltimore (1991) Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Molecular and cellular biology*, 11, 5603-11.

Sunters, A., D. P. Thomas, W. A. Yeudall & A. E. Grigoriadis (2004) Accelerated cell cycle progression in osteoblasts overexpressing the c-fos proto-oncogene: induction of cyclin A and enhanced CDK2 activity. *The Journal of biological chemistry*, 279, 9882-91.

Suuronen, E. J., H. Sheardown, K. D. Newman, C. R. McLaughlin & M. Griffith (2005) Building in vitro models of organs. *International review of cytology*, 244, 137-73.

Swift, M. R. & B. M. Weinstein (2009) Arterial-venous specification during development. *Circulation research*, 104, 576-88.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda & S. Yamanaka (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.

Takahashi, K. & S. Yamanaka (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.

Tannapfel, A., C. Busse, L. Weinans, M. Benicke, A. Katalinic, F. Geissler, J. Hauss & C. Wittekind (2001) INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 20, 7104-9.

Tay, D. L., A. V. Hoffbrand & G. R. Wickremasinghe (1996) Expression of c-fos and c-jun proteins and AP-1 binding activity during cell cycle progression of HL60 cells and phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Experimental hematology*, 24, 277-84.

Tenenbaum, T., D. Matalon, R. Adam, A. Seibt, C. Wewer, C. Schwerk, H. J. Galla & H. Schroten (2008) Dexamethasone prevents alteration of tight junction-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis* in vitro. *Brain research*, 1229, 1-17.

Tepper, O. M., J. M. Capla, R. D. Galiano, D. J. Ceradini, M. J. Callaghan, M. E. Kleinman & G. C. Gurtner (2005) Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*, 105, 1068-77.

Thanabalasundaram, G., J. Schneidewind, C. Pieper & H. J. Galla (2011) The impact of pericytes on the blood-brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43, 1284-93.

Thibodeaux, C. A., X. Liu, G. L. Disbrow, Y. Zhang, J. D. Rone, B. R. Haddad & R. Schlegel (2009) Immortalization and transformation of human mammary epithelial cells by a tumor-derived Myc mutant. *Breast cancer research and treatment*, 116, 281-94.

Tromans, A. (2001) Switching on S phase. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 873.

Tsukita, S., M. Furuse & M. Itoh (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 285-93.

van den Heuvel, S. & N. J. Dyson (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 713-24.

van Riggelen, J., A. Yetil & D. W. Felsher (2010) MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature reviews. Cancer*, 10, 301-9.

- Vass-Marengo, J., A. Ratiarson, C. Asselin & M. Bastin (1986) Ability of a T-antigen transport-defective mutant of simian virus 40 to immortalize primary cells and to complement polyomavirus middle T in tumorigenesis. *Journal of virology*, 59, 655-9.
- Vazquez, A., E. E. Bond, A. J. Levine & G. L. Bond (2008) The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 7, 979-87.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele & Z. N. Berneman (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36, 131-49.
- Verykokakis, M., C. Papadaki, E. Vorgia, L. Le Gallic & G. Mavrothalassitis (2007) The RAS-dependent ERF control of cell proliferation and differentiation is mediated by c-Myc repression. *The Journal of biological chemistry*, 282, 30285-94.
- Vierbuchen, T., A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Sudhof & M. Wernig (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463, 1035-41.
- von Andrian, U. H. & C. R. Mackay (2000) T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine*, 343, 1020-34.
- Vousden, K. H. (2002) Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica et biophysica acta*, 1602, 47-59.
- Vousden, K. H. & X. Lu (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer*, 2, 594-604.
- Walczak, C. E., S. Cai & A. Khodjakov (2010) Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11, 91-102.
- Warren, L., P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger & D. J. Rossi (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*, 7, 618-30.
- Weber, C., L. Fraemohs & E. Dejana (2007) The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 7, 467-77.
- Weber, C. & H. Noels (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine*, 17, 1410-22.
- Weidenfeller, C., S. Schrot, A. Zozulya & H. J. Galla (2005) Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain research*, 1053, 162-74.
- Wenger, A., A. Stahl, H. Weber, G. Finkenzeller, H. G. Augustin, G. B. Stark & U. Kneser (2004) Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue engineering*, 10, 1536-47.

- Wilson, A., M. J. Murphy, T. Oskarsson, K. Kaloulis, M. D. Bettess, G. M. Oser, A. C. Pasche, C. Knabenhans, H. R. Macdonald & A. Trumpp (2004) c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development*, 18, 2747-63.
- Wolf, D. A., H. Hermeking, T. Albert, T. Herzinger, P. Kind & D. Eick (1995) A complex between E2F and the pRb-related protein p130 is specifically targeted by the simian virus 40 large T antigen during cell transformation. *Oncogene*, 10, 2067-78.
- Wu, C. H., D. Sahoo, C. Arvanitis, N. Bradon, D. L. Dill & D. W. Felsher (2008) Combined analysis of murine and human microarrays and ChIP analysis reveals genes associated with the ability of MYC to maintain tumorigenesis. *PLoS genetics*, 4, e1000090.
- Wu, N., J. Rollin, I. Masse, J. Lamartine & X. Gidrol (2012) p63 regulates human keratinocyte proliferation via MYC-regulated gene network and differentiation commitment through cell adhesion-related gene network. *The Journal of biological chemistry*, 287, 5627-38.
- Wu, X., J. H. Bayle, D. Olson & A. J. Levine (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development*, 7, 1126-32.
- Yano, K., D. Gale, S. Massberg, P. K. Cheruvu, R. Monahan-Earley, E. S. Morgan, D. Haig, U. H. von Andrian, A. M. Dvorak & W. C. Aird (2007) Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium. *Blood*, 109, 613-5.
- Yao, J. C. & A. Phan (2011) Overcoming antiangiogenic resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17, 5217-9.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II & J. A. Thomson (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-20.
- Zebedee, Z. & E. Hara (2001) Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene*, 20, 8317-25.
- Zeitlin, B. D., Z. Dong & J. E. Nor (2012) RAIN-Droplet: a novel 3D in vitro angiogenesis model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*.
- Zenker, D., D. Begley, H. Bratzke, H. Rubsamen-Waigmann & H. von Briesen (2003) Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *The Journal of physiology*, 551, 1023-32.
- Zhang, B., W. Chen & A. Roman (2006a) The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 437-42.

- Zhang, H., Y. Jin, X. Chen, C. Jin, S. Law, S. W. Tsao & Y. L. Kwong (2007a) Papillomavirus type 16 E6/E7 and human telomerase reverse transcriptase in esophageal cell immortalization and early transformation. *Cancer letters*, 245, 184-94.
- Zhang, X. B., J. L. Schwartz, R. K. Humphries & H. P. Kiem (2007b) Effects of HOXB4 overexpression on ex vivo expansion and immortalization of hematopoietic cells from different species. *Stem cells*, 25, 2074-81.
- Zhang, Y., X. H. Feng & R. Derynck (1998) Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*, 394, 909-13.
- Zhang, Y., C. S. Li, Y. Ye, K. Johnson, J. Poe, S. Johnson, W. Bobrowski, R. Garrido & C. Madhu (2006b) Porcine brain microvessel endothelial cells as an in vitro model to predict in vivo blood-brain barrier permeability. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 34, 1935-43.
- Zhang, Z., A. J. McGoron, E. T. Crumpler & C. Z. Li (2011) Co-culture based blood-brain barrier in vitro model, a tissue engineering approach using immortalized cell lines for drug transport study. *Applied biochemistry and biotechnology*, 163, 278-95.
- Zhou, H., J. Gao, Z. Y. Lu, L. Lu, W. Dai & M. Xu (2007) Role of c-Fos/JunD in protecting stress-induced cell death. *Cell proliferation*, 40, 431-44.
- Zhou, Q., J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal & D. A. Melton (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, 455, 627-32.
- Zhu, H., M. W. Lensch, P. Cahan & G. Q. Daley (2011) Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nature reviews. Genetics*, 12, 266-75.
- Zitzelsberger, H., J. Bruch, J. Smida, L. Hieber, C. M. Peddie, P. E. Bryant, A. C. Riches, J. Fung, H. U. Weier & M. Bauchinger (2001) Clonal chromosomal aberrations in simian virus 40-transfected human thyroid cells and in derived tumors developed after in vitro irradiation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 96, 166-77.
- Zwerschke, W. & P. Jansen-Durr (2000) Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Advances in cancer research*, 78, 1-29.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus und seiner Phasen	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Restriktionspunkte des Zellzyklus.....	11
Abbildung 3: Mechanismus des pRB induzierten Zellzyklusblocks in der G1-Phase.....	12
Abbildung 4: pRB vermittelte Transition aus der G1 in die S-Phase des Zellzyklus.....	13
Abbildung 5: p53-unabhängiger G2-Zellzyklusblock.....	14
Abbildung 6: p53-abhängiger G2-Zellzyklusblock.....	15
Abbildung 7: Aufbau und Struktur von Blutgefäßen	24
Abbildung 8: Beispiel eines 1% Agarosegels der ersten 29 PCR-Analysen der Linie I46-12	33
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Aufbaus der zur Immortalisierung verwendeten Lentiviren	46
Abbildung 10: Kumulative Populationsverdopplung der ersten HUVEC Infektionsrunde (I49)	48
Abbildung 11: Kumulative Populationsverdopplung der zweiten HUVEC Infektionsrunde (I20)	50
Abbildung 12: Kumulative Populationsverdopplungen der dritten Infektionsrunde (I38)	53
Abbildung 13: Kumulative Populationsverdopplungen der Zelllinien von I46.....	56
Abbildung 14: Kumulative Populationsverdopplungen der Zelllinien von I8.....	58
Abbildung 15: Kumulative Populationsverdopplung der PBEC-Infektionen.....	61
Abbildung 16: Morphologie der unterschiedlichen Endothelzellen.....	62
Abbildung 17: Expression des Oberflächenmarkers PECAM-1	63
Abbildung 18: Expression des Oberflächenmarkers VEGFR-2	64
Abbildung 19: Expression des TIE-1-Rezeptors auf der endothelialen Oberfläche	65
Abbildung 20: Expression des TIE-2-Rezeptors auf der endothelialen Oberfläche	65
Abbildung 21: Die Leukozyten-Endothel Adhäsionskaskade.....	66
Abbildung 22: Expression des durch Inflammation induzierbaren Oberflächenmarkers E-Selektin	68
Abbildung 23: Expression des durch Inflammation induzierbaren Oberflächenmarkers ICAM-1	69
Abbildung 24: Expression des durch Inflammation induzierbaren Oberflächenmarkers VCAM-1	70
Abbildung 25: Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein	71
Abbildung 26: Aktivität der endothelialen NO-Synthase	73
Abbildung 27: Messung des Trans-Endothelialen Widerstandes der HUVEC-Zellen.....	74
Abbildung 28: Messung des Trans-Endothelialen Widerstandes der HMVEC-Zellen.....	75
Abbildung 29: Matrigel-Assay zur Evaluierung der Angiogenese in vitro.....	77
Abbildung 30: Etablierung von Endothelzellsphäroiden.....	78
Abbildung 31: Histologie der re-isolierten Matrigelplugs	79
Abbildung 32: Ausschnitt der „Heat Map“ der globalen Transkriptom-Expressionsanalyse...	80
Abbildung 33: Softagar-Assay zur Evaluierung der Tumorigenität in vitro	81

Abbildung 34: Stabilität der Oberflächenmarker-Expression der HUVEC-Linie I38-2	86
Abbildung 35: Stabilität der Expression der inflammationsabhängigen Oberflächenmarker der Linie HUVEC I38-2.....	87
Abbildung 36: Vergleich der Stabilität der HUVEC I38-Zelllinien für die Expression von CD31	88
Abbildung 37: Stabilität der HUVEC I38 Zelllinien für die Aufnahme von acLDL und die Aktivität der eNOS	90
Abbildung 38: Sorting der polyklonalen HUVEC Linie I38-5	91
Abbildung 39: Kumulative Populationsverdopplungen der Infektionen von I45.....	93
Abbildung 40: Expression des Oberflächenmarkers CD31	94
Abbildung 41: Aufnahme des acetylierten LDL	95
Abbildung 42: Aktivität der eNOS.....	96
Abbildung 43: Regulation der G1-S-Phasen Transition durch ID-2 und pRB.....	100

Tabellen:

Tabelle 1: Fragmentgrößen der PCR-Produkte der entsprechenden Gene der Immortalisierungsgenbank	34
Tabelle 2: Genbank der zur Immortalisierung verwendeten Gene.....	45
Tabelle 3: Erste HUVEC Infektionsrunde I49.....	49
Tabelle 4: Zweite HUVEC Infektionsrunde I20	51
Tabelle 5: Zur Infektion verwendete Gene der Infektionen I38.....	52
Tabelle 6: Dritte HUVEC Infektionsrunde I38.....	53
Tabelle 7: Erste HMVEC Infektionsrunde I46.....	55
Tabelle 8: Die über PCR-Analyse detektierten Gene der drei HMVEC-Zelllinien	56
Tabelle 9: Zweite HMVEC Infektionsrunde I8	57
Tabelle 10: Infektionen der PBEC Zellen	60
Tabelle 11: Für die globale Transkriptom-Expressionsanalyse verwendete Zellen:.....	79
Tabelle 12: Evaluierung der Tumorigenität in vivo	82
Tabelle 13: PCR-Analyse der ex-vivo isolierten Tumore und der in vitro kultivierten HMVEC-Zelllinie I46-12	83
Tabelle 14: Zellen die in der Karyotypen-Analyse untersucht wurden	84
Tabelle 15: Zelllinien anhand derer die Stabilität der Expression endothelspezifischer Marker und Funktionen untersucht wurde	85
Tabelle 16: Durchgeführte Infektionen um die Reproduzierbarkeit zu untersuchen	92
Tabelle 17: Die in HMVEC I46-12 durch PCR detektierten im Genom integrierten Immortalisierungsgene.....	104